

**Aktivierung eines kontakt-abhängigen
Signalsystems durch regulierte Proteolyse in
*Myxococcus xanthus***

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ANNE ROLBETZKI
aus Kassel

Marburg/Lahn im November 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2004 bis November 2007 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. PhD MD Lotte Sogaard-Andersen durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am _____
angenommen.

Erstgutachter:	Prof. PhD MD Lotte Sogaard-Andersen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse werden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Rolbetzki, A. & Sogaard-Andersen, L. (2007). Activation of a contact-dependent intercellular signaling system by regulated proteolysis in *Myxococcus xanthus*. *Submitted*.

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.*

Takeshita, N., Vienken, K., Rolbetzki, A. & Fischer, R. (2007). The *Aspergillus nidulans* putative kinase, KfsA (kinase for septation), plays a role in septation and is required for efficient asexual spore formation. *Fungal. Genet. Biol.*

In Liebe Marcus

„Wartet mal“, sagte Oliviera. „Es gibt ähnliche Formen der Kommunikation bei Bakterien. *Myxococcus xanthus* zum Beispiel. Eine bodenlebende Art. Sie setzt sich aus kleinen, lockeren Verbänden zusammen. Wenn einzelne Zellen nicht genug zu fressen finden, geben sie eine Art Hungersignal ab. Anfangs reagiert die Kolonie kaum darauf, aber je mehr Zellen hungern, desto intensiver wird das Signal, bis es eine gewisse Schwelle überschreitet. Die Mitglieder der Kolonie beginnen sich zusammenzuscharen. Nach und nach formt sich ein komplexes vielzelliges Gebilde, ein Fruchtkörper, den man mit bloßem Auge sehen kann.“

Auszug aus „Der Schwarm“ von Frank Schätzing, erschienen 2004 im Verlag Kiepenheuer & Witsch, Köln.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Lebenszyklus und Entwicklung von <i>M. xanthus</i>.....	4
2.2 Gleitende Fortbewegung in <i>M. xanthus</i>	6
2.3 Interzelluläre Kommunikation	9
2.4 Das C-Signal von <i>M. xanthus</i>	10
2.5 Regulierte Proteolyse und Serin-Proteasen	16
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Chemikalien und Materialien	21
3.2 Enzyme	22
3.3 Medien.....	22
3.4 Mikrobiologische Methoden	25
3.4.1 Bakterienstämme	25
3.4.2 Kultivierung von Bakterien	29
3.4.3 Lagerung transformierter <i>M. xanthus</i> - und <i>E. coli</i> -Stämme	30
3.4.4 Kultivierung von <i>M. xanthus</i> für Entwicklungszyklus	30
3.4.5 Bestimmung der Sporulationseffizienz von <i>M. xanthus</i> -Stämmen.....	31
3.4.6 Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von <i>M. xanthus</i> -Stämmen	31
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.5.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide.....	32
3.5.2 Herstellung der Plasmidkonstrukte.....	42
3.5.3 Herstellung von Insertionsmutanten von <i>M. xanthus</i>	44
3.5.4 Konstruktion von "in frame" Deletionsmutanten von <i>M. xanthus</i>	45
3.5.5 Präparation von DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3.5.7 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	48
3.5.8 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	49
3.5.9 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	49
3.5.10 Transformation von <i>E. coli</i> - Zellen.....	50
3.5.11 Transformation von <i>M. xanthus</i> -Zellen.....	50
3.5.12 Herstellung chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	51
3.5.13 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> für "Yeast-Two-Hybrid"-Analysen	51

3.5.14	Sequenzierung von DNA.....	52
3.5.15	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	53
3.6	Biochemische Methoden	54
3.6.1	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	54
3.6.2	Aufreinigung von Proteinen mit His ₆ -Tag	55
3.6.3	Reinigung von Einschlusskörpern und Rückfaltung von Proteinen	57
3.6.4	Biochemische Zellfraktionierung	58
3.6.5	Untersuchung sekretierter Proteine.....	58
3.6.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	59
3.6.7	<i>In vitro</i> Protease-Assay	59
3.6.8	Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.6.9	Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse.....	62
3.6.10	Antiseren und Affinitätsaufreinigung von Antikörpern.....	63
3.6.11	Identifizierung von Proteinen/Peptiden durch Massenspektrometrie	64
3.7	Bioinformatische Methoden	65
3.7.1	Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche	65
3.7.2	Strukturvorhersage von Domänen	65
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Genomanalyse von <i>M. xanthus</i>.....	67
4.1.1	Entwicklungsphänotypen der Insertionsmutanten	72
4.2	Untersuchung von <i>MXAN0206</i>.....	75
4.2.1	Genetischer Kontext von <i>MXAN0206</i>	76
4.2.2	Genetische Komplementation	78
4.2.3	Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von <i>MXAN0206</i>	80
4.2.4	Untersuchung einer <i>MXAN0206</i> "Active Site"-Mutante	81
4.2.5	Akkumulation von p25 und p17 <i>in vivo</i>	85
4.2.6	Überproduktion und Aufreinigung von <i>MXAN0206</i>	86
4.2.7	Akkumulation von <i>MXAN0206 in vivo</i>	88
4.2.8	Subzelluläre Lokalisation und Sekretion von <i>MXAN0206</i>	90
4.2.9	p25 wird von <i>MXAN0206 in vitro</i> direkt gespalten	92
4.2.10	Extrazelluläre Komplementation in Flüssigkultur	93
4.3	Untersuchung des stromabwärts liegenden Gens <i>MXAN0207</i>	95
4.3.1	Herstellung einer "in frame" Deletionsmutante von <i>MXAN0207</i>	95
4.3.2	Überproduktion und Aufreinigung von <i>MXAN0207</i>	97
4.3.3	Western Blot Analysen mit α- <i>MXAN0207</i>	99
4.4	"Yeast-Two-Hybrid"-Analysen	100
4.5	Proteinkonstrukte für Interaktionsstudien.....	104
4.5.1	Überproduktion und Aufreinigung der Peptidase-Domäne von <i>MXAN0206</i>	104
4.5.2	Überproduktion und Aufreinigung der N-terminalen Verlängerung von <i>MXAN0206</i> ...	106

5	Diskussion.....	109
5.1	MXAN0206 ist PopC	112
5.2	Regulierte Proteolyse.....	115
6	Literaturverzeichnis.....	120
7	Danksagung	136
8	Lebenslauf	137

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isoproyl-b-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehung pro Minute („rounds per minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-b-D-Galaktosid

1 Zusammenfassung

Das C-Signal von *Myxococcus xanthus* ist ein interzelluläres Signalmolekül, welches die Aggregation von Zellen zu Fruchtkörpern, die Sporulation und die Expression von Genen nach 6 Stunden Entwicklung induziert. Bei dem C-Signal handelt es sich um ein 17 kDa Protein (p17), welches in der äußeren Membran verankert ist und durch die proteolytische Spaltung des 25 kDa CsgA-Proteins (p25) entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Protease (PopC), die in die Spaltung von p25 involviert ist, eine Serine Protease ist, dass sie während der Entwicklung hoch reguliert und voraussichtlich sekretiert wird (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003).

Basierend auf diesen Informationen wurde eine dreistufige Strategie zur Identifizierung von *popC* Kandidaten entwickelt. Als erstes wurden 146 Gene im *M. xanthus* Genom gefunden, die für Proteasen kodieren. 32 dieser Gene kodieren für sekretierte Serin Proteasen. Als zweites wurde auf die biochemischen Charakteristika dieser Proteasen geschaut und zu letzt die Daten von DNA-Microarrays bzw. der quantitativen real-time PCR herangezogen. Somit wurden 8 Gene gefunden, die während der Entwicklung reguliert werden. Nur die Inaktivierung von *MXAN0206* führt zu einem Defekt während der Entwicklung. Die *MXAN206* Mutante wird von hier an *popC* Mutante genannt.

Die *popC* Mutante kann nur wenig aggregieren, aber keine Fruchtkörper ausbilden und hat einen signifikanten Defekt in der Sporulation. Zudem kann in der *popC* Mutante kein p17 detektiert werden. *popC* kodiert für eine 51 kDa Subtilisin-ähnliche Protease mit einer für Subtilisin charakteristischen katalytischen Triade. Eine „Active-Site“ Mutante von *popC* zeigt den gleichen Entwicklungsphänotyp wie eine *popC* Mutante und ist unfähig p17 zu synthetisieren. PopC kommt sowohl in vegetativen als auch in hungernden Zellen vor, aber es wird während der Entwicklung selektiv sekretiert. Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass gereinigtes PopC p25 direkt zu p17 spalten kann. Wir vermuten, dass regulierte *MXAN0206* Sekretion ein Garant dafür ist, dass nur während der Entwicklung p25 und PopC im gleichen Zellkompartiment zu finden sind und somit die p17-Synthese auf hungernde Zellen beschränkt ist.

2 Einleitung

Bakterien sind sich immer ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Dies betrifft sowohl das Nahrungsangebot, als auch Schwankungen der Temperatur oder des pH-Wertes ihres Milieus. Aus diesen Gründen müssen Bakterien fähig sein, sich den wechselnden Bedingungen anzupassen, um überleben zu können. Einer solchen Anpassung liegt allerdings die Fähigkeit individueller Zellen zu Grunde, untereinander zu kommunizieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion und Kommunikation einzelner Zellen von Myxobakterien – einer Ordnung von Bakterien, welche sich durch ihre Fähigkeit zur Anpassung auszeichnet.

Bei Myxobakterien handelt es sich um Gram-negative, stäbchenförmige Bodenmikroorganismen, die zu der Ordnung Myxococcales der δ -Proteobakterien gezählt werden. Myxobakterien können eine Länge von bis zu 15 μm und einen Durchmesser von bis zu 1,2 μm erreichen. Fast alle Vertreter der chemoorganotrophen Myxobakterien leben strikt aerob. Die einzige Ausnahme bildet *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford et al., 2002).

Diese Arbeit befasst sich mit dem Modellorganismus *Myxococcus xanthus*, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Es hat eine Größe von 9,14 Millionen Basenpaaren und besitzt 7380 protein-kodierende Gene. Aufgrund der Etablierung vieler molekularbiologischer Methoden ist dieser Organismus ein ideales System zur Untersuchung komplexer, zellulärer Prozesse in Myxobakterien, wie beispielsweise die Bildung von Fruchtkörpern.

Weiterhin sekretieren Myxobakterien eine Vielzahl von Exoenzymen sowie antibiotisch wirksame Substanzen. Dadurch ist es ihnen möglich, andere Mikroorganismen zu lysieren und töten, um sie als Nahrungsquelle zu verwerten (Hart & Zahler, 1966). Zudem zeigen Myxobakterien ein hochentwickeltes „soziales“ Verhalten. Ausgelöst wird dieses unter anderem bei Nahrungsmangel und endet nach Aggregation in der Bildung von Fruchtkörpern und der Differenzierung der Zellen innerhalb der Fruchtkörper zu Myxosporen (Reichenbach, 1999). Des Weiteren tritt das „soziale“ Verhalten auch bei der gemeinschaftlichen Ernährungstrategie, auch „Wolfsrudel-Ernährung“ genannt, auf (Rosenberg et al., 1977).

2.1 Lebenszyklus und Entwicklung von *M. xanthus*

Der Lebenszyklus von Myxobakterien kann in zwei Bereiche aufgeteilt werden - den vegetativen Zellwachstumszyklus und den Entwicklungszyklus. Sind genügend Nährstoffe in der Umgebung vorhanden, bewegen sich die vegetativen Zellen auf festen Oberflächen in koordinierten Schwärmen fort und teilen sich. Eine ausführliche Beschreibung der Fortbewegungssysteme von *M. xanthus* erfolgt später. Diese Schwärme setzen sich aus tausenden Zellen zusammen, welche hydrolytische Enzyme in ihre Umgebung sekretieren. Die sekretierten Exoenzyme lysieren andere Zellen und wandeln unlösliche Proteine in lösliche, transportierbare Aminosäuren um. Man nennt diese gemeinschaftliche Ernährungsstrategie „Wolfsrudel-Ernährung“ (Rosenberg, et al., 1977), und sie erhöht die Nährstoffumsetzung im Vergleich zu einer einzelnen Zelle erheblich.

Unter nährstoffarmen Bedingungen wird bei ausreichend hoher Zelldichte auf einer festen Oberfläche ein komplexes Entwicklungsprogramm initiiert. Dieses endet in der Bildung von Fruchtkörpern und in der Differenzierung von vegetativen Zellen zu Myxosporen bzw. zu peripheren Zellen, die die Fruchtkörper umgeben.

Abbildung 1A zeigt eine schematische Darstellung des Entwicklungszyklus, und Abbildung 1B dokumentiert dessen morphologische Stadien. Nach vier bis sechs Stunden beginnen die Zellen zu aggregieren, und erste kleine Aggregationszentren werden sichtbar. Durch das Eintreten weiterer Zellen vergrößern sich diese Aggregationszentren zu kleinen Hügeln, in denen sich die Zellen in Kreisen strömend fortbewegen (Abb. 1A). Letztendlich kommt es nach ca. 24 Stunden zur Bildung von artspezifischen, multizellulären Fruchtkörpern (McCurdy, 1974).

Im Fall von *M. xanthus* umfasst ein domförmig-gewölbter Fruchtkörper ungefähr 10^5 Zellen. Von der anfänglich hungernden Gesamtpopulation differenzieren sich innerhalb des Fruchtkörpers nur ca. 1 bis 3 % zu Myxosporen (Sogaard-Andersen et al., 1996; Wireman & Dworkin, 1977). Die anderen Zellen differenzieren zu peripheren Zellen, welche die Myxosporen umgeben, oder fallen der Zell-Lyse zum Opfer. Nach 72 Stunden ist die Differenzierung der Myxosporen abgeschlossen, und sie sind widerstandsfähig

gegenüber Hitze und Trockenheit. Durch diese Strategie können die Zellen solange überdauern bis eine Verbesserung des Nahrungsangebots eintritt (Kroos et al., 1988; Shimkets & Dworkin, 1981). Unter nährstoffreichen Bedingungen keimen die Sporen aus, und der Zellwachstumszyklus beginnt von neuem. Myxobakterien nutzen ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung als Überlebensstrategie.

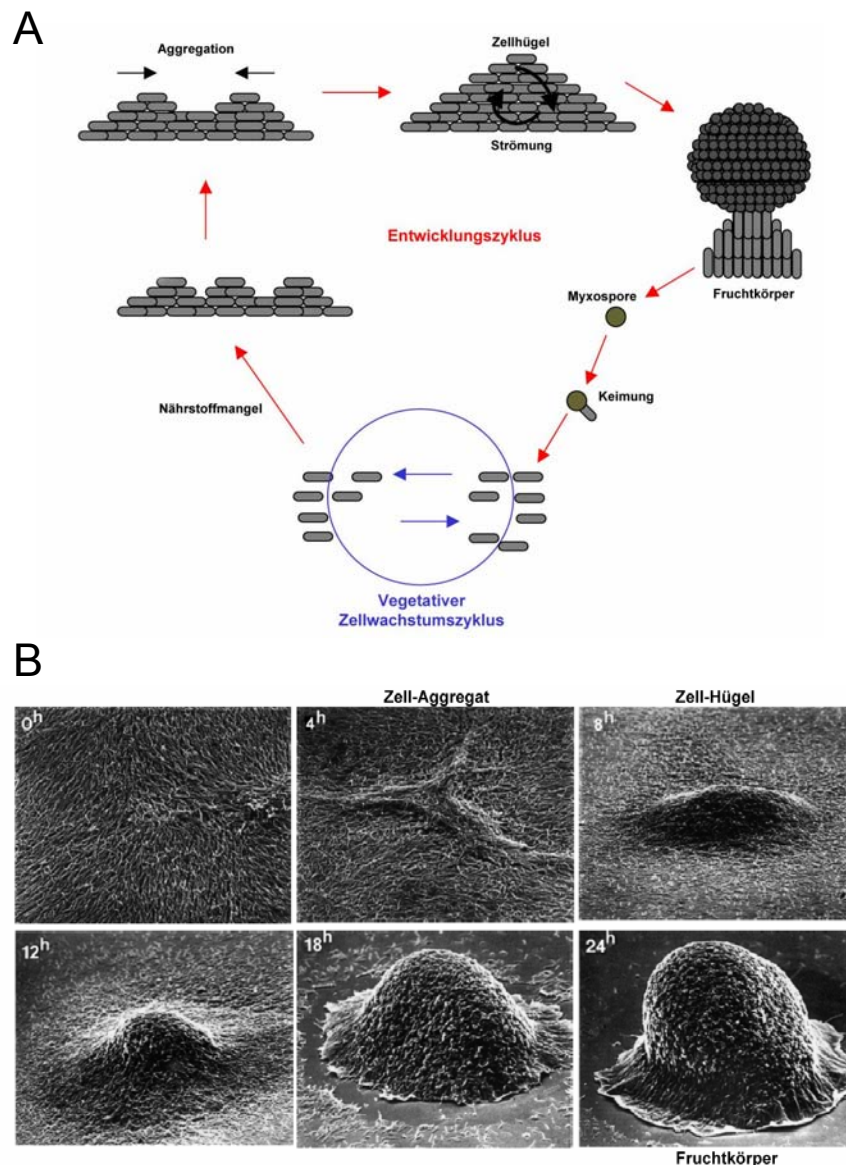


Abbildung 1: Vegetativer Zellwachstumszyklus und Entwicklungszyklus von *Myxococcus xanthus*. (A) Schematische Darstellung der einzelnen Schritte im Lebenszyklus von Myxobakterien. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im Text. Die schwarzen Pfeile deuten die Zellbewegungsrichtung an. Schema aus der Diplomarbeit von Simone Leonardy, 2005. (B) Dargestellt sind die verschiedenen morphologischen Stadien im Entwicklungszyklus (Kuner & Kaiser, 1982) bis zur Bildung des Fruchtkörpers. Jeweils links oben im Bild befindet sich eine Zeitangabe, die Auskunft über die Dauer des Nährstoffmangels gibt.

2.2 Gleitende Fortbewegung in *M. xanthus*

M. xanthus bewegt sich während des vegetativen Zellwachstumszyklus auf festen Oberflächen gleitend in Richtung seiner Längsachse fort (Henrichsen, 1972). Bei dieser gleitenden Fortbewegung kann *M. xanthus* Geschwindigkeiten bis zu 6 μm pro Minute erreichen (Spormann & Kaiser, 1995). Um die Fortbewegungssysteme in *M. xanthus* zu studieren, begann man mit der Isolierung von sich nicht ausbreitenden Mutanten. Dabei konnten zwei genetisch unterschiedliche Systeme identifiziert werden, die für die Bewegung verantwortlich sind (Hodgkin & Kaiser, 1979a; Hodgkin & Kaiser, 1979b). Zu einem gibt es das S-System (S für „social“), welches Zellkontakt abhängig ist. Zu anderen existiert das A-System (A für „adventurous“), welches die Bewegung einzelner Zellen ermöglicht.

In Wildtyp-Zellen (A^+S^+) arbeiten die beiden Systeme synergistisch. Am Rand einer Wildtyp-Kolonie findet man sowohl mobile Zellgruppen als auch mobile Einzelzellen (Abb. 2). Die kombinierte Schwärmrate der Wildtyp-Zellen (A^+S^+) ist 50% höher als die Summe der beiden einzelnen Schwärmraten (A^+S^- und A^-S^+), die jeweils nur von einem System gestellt wird (Kaiser & Crosby, 1983a; Kaiser & Crosby, 1983b). Zellen, die Mutationen in beiden Systemen (A^-S^-) besitzen, sind nicht zur gleitenden Bewegung fähig. Die Kolonien solcher Mutanten haben glatte Ränder (Abb. 2), und diese können keine Fruchtkörper bilden.

S-Mutanten bewegen sich nur mit Hilfe des A-Systems, und an ihren Kolonierändern sind größtenteils nur einzelne Zellen zu beobachten, während große, mobile Zellgruppen fehlen (Abb. 2). Im Vergleich zum Wildtyp (A^+S^+) bilden S-Mutanten deutlich kleinere Kolonien. Für das A-System sind zwei Modelle beschrieben. Hinweise für das erste Modell ergeben sich aus der Beobachtung von Schleimspuren am Kolonierand im Phasenkontrastmikroskop (Wolgemuth et al., 2002). Elektronenmikroskopisch konnten an beiden Zellpolen Strukturen („nozzle-like structures“) identifiziert werden, welche möglicherweise wichtig für die Schleim-Sekretion sind. Man geht davon aus, dass dieser Schleim in einer dehydratisierten Form in diese Strukturen eingeschleust wird. Durch die Zufuhr von Wasser quillt der Schleim an und wird nach außen gepresst. Somit würde eine Art Schubkraft entstehen, die der Zelle

eine Vorwärtsbewegung ermöglicht (Wolgemuth, et al., 2002). Allerdings sind die molekularen Zusammenhänge noch weitgehend unbekannt. Das zweite Modell beschreibt Adhäsionskomplexe, welche, relativ zum Untergrund der Zelle, an einer festen Position in der Zelle verbleiben, während diese sich fortbewegt. Die Komplexe sammeln sich am Vorderende der Zelle und vereinzeln sich am Hinterende der Zelle. Wenn die Zelle ihre Richtung ändert, verlagert sich das A-System-Cluster zusammen mit den Proteinen des S-Systems zum neuen Vorderende der Zelle (Mignot et al., 2007).

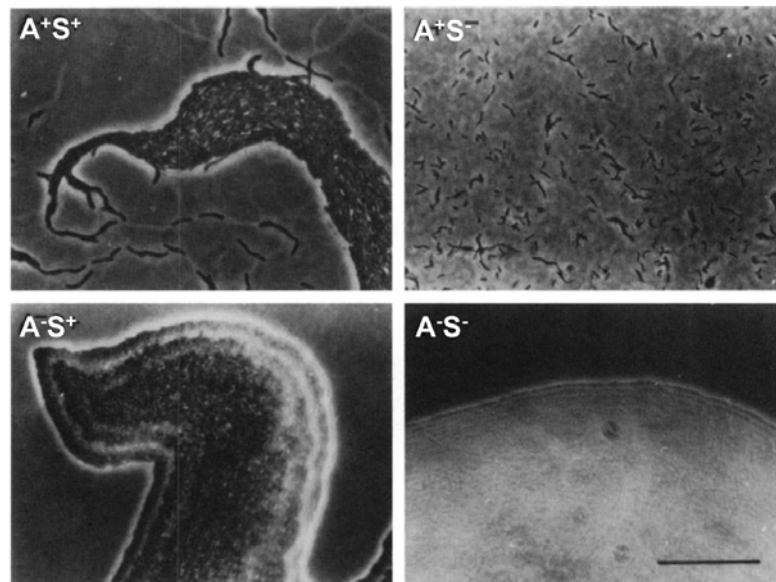


Abbildung 2: Morphologie von Kolonierändern verschiedener *M. xanthus*-Stämme. A^+S^+ Zellen sind Wildtyp-Zellen, welche sich mit beiden Systemen fortbewegen. A^+S^- Zellen sind nur mittels des A-Systems mobil. A^-S^+ Zellen zeigen nur Bewegung, die von dem S-System generiert wird. A^-S^- Zellen sind nicht mobil. Die Abbildung wurde von (Shimkets, 1986) modifiziert. Der schwarze Balken entspricht 50 μm .

A-Mutanten bewegen sich mit Hilfe des S-Systems fort und bilden am Rand der Kolonien lange speerförmige Zellgruppen. Wie in Abbildung 2 dargestellt, sind keine einzelnen Zellen zu erkennen. Typ-IV-Pili, welche unipolar lokalisiert sind (Kaiser, 1979), sind essentiell für die S-Bewegung, da Mutanten ohne Typ-IV-Pili das S-Bewegungssystem nicht ausbilden können (Wu & Kaiser, 1995). Die resultierende Bewegung wird dadurch generiert, dass sich die Typ-IV-Pili ausstrecken und an eine feste Oberfläche heften. Wenn die Pili verkürzt werden, wird die Zelle nach vorne gezogen (Merz et al., 1999; Skerker & Berg, 2001; Sun et al., 2000). Weiterhin ist das S-

System von extrazellulären Matrix-Fibrillen abhängig (Li et al., 2003). Diese bestehen aus Polysacchariden und Proteinen und umhüllen die komplette Zelloberfläche. Den Zellen ist es möglich, über Typ-IV-Pili an die extrazelluläre Matrix einer anderen Zelle zu binden und sich durch Retraktion der Typ-IV-Pili vorwärts zu bewegen (Li, et al., 2003). Mutanten mit einem Defekt in der Synthese des Lipopolysaccharid O-Antigens sind ebenfalls nicht zur S-Bewegung fähig, obwohl sie Typ-IV-Pili besitzen (Bowden & Kaplan, 1998).

Vegetative Zellen von *M. xanthus* ändern im Durchschnitt alle sieben Minuten ihre Bewegungsrichtung (Blackhart & Zusman, 1985). Dazu wechseln die Bakterien ihre Zellpolarität, so dass das Vorderende zum Hinterende wird und umgekehrt (Abb. 3) (Blackhart & Zusman, 1985).

Für die Häufigkeit dieser Richtungswechsel ist das chemosensorische Frz-Signaltransduktionssystem verantwortlich. Es ist eines von acht bisher identifizierten chemosensorischen Transduktionssystemen in *M. xanthus*, allerdings das einzige, welches die Frequenz der Zellrichtungswechsel beeinflusst (Vlamakis et al., 2004). Die Frz- („fizzy“) Proteine besitzen Sequenzhomologien zum Che-Transduktionssystem aus *Escherichia coli* (McBride et al., 1989). Die Häufigkeit der Bewegungsrichtungswechsel wird durch die Methylierung von FrzCD, einem zytoplasmatischen MCP-Homolog, reduziert (Abb. 5). Durch Analysen von Frz-Mutanten konnte gezeigt werden, dass das Frz-System essentiell für die Bildung von Fruchtkörpern ist (Zusman, 1982). Denn erst durch eine Verringerung der Frequenz der Richtungswechsel ist *M. xanthus* zur Aggregation fähig. Das Frz-System induziert die Relokalisation der Bewegungsproteine AglZ, FrzS und RomR (Leonardy et al., 2007; Mignot et al., 2007; Yang et al., 2004).

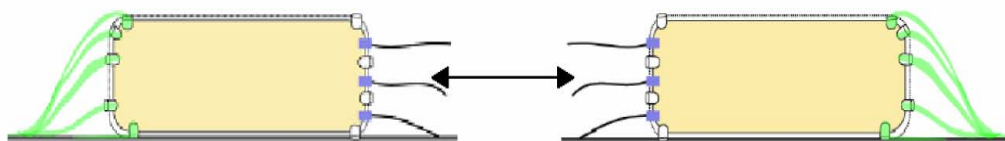


Abbildung 3: Schema der Regulation des Polaritätswechsels in *M. xanthus*. Längsschnitt zweier Zellen, die ihre Zellpolarität wechseln. Die violetten Rechtecke stellen die Proteine für die Biogenese der Typ-IV-Pili und deren Retraktion dar. Die weißen Strukturen markieren die „nozzle-like structures“, die an beiden Polen lokalisiert sind. Jedoch nur an einem Pol wird Schleim (grün) sekretiert. Schema aus der Diplomarbeit von Simone Leonardy, 2005.

2.3 Interzelluläre Kommunikation

Die der Bildung von Fruchtkörpern zugrundeliegenden physiologischen und morphologischen Vorgänge werden erst durch eine ausgeprägte Zell-Zell-Kommunikation möglich (Kroos & Kaiser, 1987). Für die Kommunikation sind diffusionsfähige und kontakt-abhängige Signalmoleküle verantwortlich. Die Signalmoleküle werden von hungernden Zellen gebildet und weisen die Nachbarzellen auf die sich ändernden Bedingungen hin. Durch Untersuchungen zur extrazellulären Komplementation konnte gezeigt werden, dass Zellen von *M. xanthus* verschiedene extrazelluläre Signale miteinander austauschen. Entsprechend den Komplementationsmutanten wurden diese Signale in fünf Klassen eingeteilt (A-, B-, C-, D- und E-Signal), wobei die Mutante einer Klasse die Entwicklung von Mutanten aus einer anderen Klasse komplementieren können (Downard et al., 1993; Hagen et al., 1978). Findet keine Komplementation statt, bleibt die Entwicklung der Mutante in einem für die Signalklasse charakteristischem Stadium und abhängig von der spezifischen Genexpression des jeweiligen Signals stehen (Kaiser, 2004).

Die B-, D- und E-Signale sind wichtig für die ersten fünf Stunden der Entwicklung (Cheng & Kaiser, 1989; Cheng & Kaiser, 1989; Downard, et al., 1993; Kroos & Kaiser, 1987). Ihre Funktionen sind derzeit noch weitgehend unbekannt (Abb. 4).

Das A-Signal ist ein Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden, die in der frühen Entwicklungsphase die Aggregation der Zellen als eine Art „quorum sensing“ steuern (Kuspa et al., 1986). An der Synthese des A-Signals scheinen fünf Gene beteiligt zu sein, die durch verschiedene *asg* Mutanten charakterisiert werden (Cho & Zusman, 1999; Garza et al., 2000; Kuspa & Kaiser, 1989). *AsgA* und *AsgD* sind Proteine von Zwei-Komponenten-Systemen (Plamann et al., 1995), bei *AsgB* handelt es sich wahrscheinlich um ein DNA-Bindeprotein (Plamann et al., 1994) und das Produkt des *asgC*-Gens ist möglicherweise ein Sigma-Faktor (SigA) von *M. xanthus* (Davis et al., 1995), der Sequenzähnlichkeiten zu RpoD zeigt. Zudem wurde *asgE* entdeckt, dessen Protein Sequenzähnlichkeiten zu einer Aminohydrolase zeigt (Garza, et al., 2000). Da all diese Proteine für die Produktion des A-Signals notwendig sind, vermutet man, dass sie alle Bestandteile desselben Signal-Transduktionsweges

sind (Kaiser, 2004). Das A-Signal an sich wird nach 2 Stunden Hungerzustand in das Medium abgegeben und steigt proportional zur Zelldichte an. Man kann das A-Signal in eine hitzestabile, niedermolekulare Fraktion (Aminosäuren und Peptide) und in eine hitzelabile, hochmolekulare Fraktion, bestehend aus zwei Proteasen, unterteilen. Diese Proteasen zeigen Ähnlichkeit zu Trypsin (Plamann et al., 1992) und sind wahrscheinlich an der Bildung der Aminosäuren und Peptide beteiligt. Durch das A-Signal soll gewährleistet werden, dass genügend Zellen hungern, bevor es zu einer Initiierung der Fruchtkörperbildung kommt (Bowden & Kaplan, 1996). Im nächsten Abschnitt wird die Funktion und Wirkungsweise des C-Signals ausführlich beschrieben.

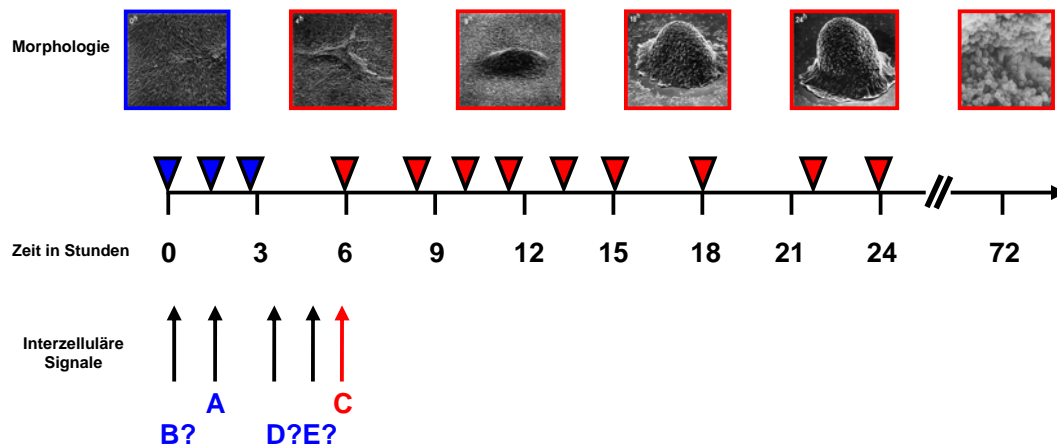


Abbildung 4: Interzelluläre Signale während des Entwicklungszyklus und der Morphogenese der multizellulären Fruchtkörper in *M. xanthus*. Auf der Zeitachse werden die Zeitpunkte der Genexpression vor der Initiierung des C-Signals durch die blauen Dreiecke gekennzeichnet. Die roten Dreiecke stellen die C-Signal-abhängige Genexpression dar. Das Auftreten der einzelnen Signale wird durch die schwarzen bzw. orangenen Pfeile angezeigt. Über der Zeitachse befinden sich Bilder mit den verschiedenen Stadien der Fruchtkörperbildung. Abbildung modifiziert nach (Sogaard-Andersen et al., 2003).

2.4 Das C-Signal von *M. xanthus*

Das C-Signal ist das Signal, welches im Entwicklungszyklus als letztes aktiv wird. Es ist essentiell, um sechs Stunden nach Eintritt in die Hungerphase das Fortschreiten der Entwicklung zu gewährleisten (Kroos & Kaiser, 1987). Das C-Signal-Protein wird durch das *csgA*-Gen kodiert. *csgA*-Mutanten sind nicht imstande zu aggregieren und zu sporulieren (Shimkets et al., 1983). Zudem ist die Expression von Genen, die normalerweise nach sechs Stunden angeschaltet werden, reduziert oder findet gar nicht statt (Kroos & Kaiser,

1987). Es wurde gezeigt, dass das C-Signal die Aggregation, die Sporulation und die oben erwähnte Expression der Gene konzentrations-abhängig induziert (Kim & Kaiser, 1991; Kruse et al., 2001; Li et al., 1992). Somit verursachen niedrige Konzentrationen des C-Signals die Bildung von Zellwellen („rippling“). Mittlere Konzentrationen induzieren die Expression der frühen C-Signal-abhängigen Gene sowie die Aggregation der Zellen, während hohe Konzentrationen zur Expression der späten C-Signal-abhängigen Gene und zur Sporulation führen. Eine korrekte zeitliche Abfolge dieses Prozesses wird durch das Ansteigen der C-Signal-Konzentration während der Entwicklung gesichert. Die räumliche Koordination der Entwicklung ist dadurch gegeben, dass die Übertragung des C-Signals von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig ist (Kaiser, 2004; Kruse, et al., 2001).

CsgA kommt in zwei Formen vor – als Protein mit einer molekularen Masse von 25 kDa (p25), was mit der kompletten Sequenz von CsgA übereinstimmt, und als Protein mit einer molekularen Masse von 17 kDa (p17) (Kruse, et al., 2001), welches dem C-terminalen Teil von p25 entspricht (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). p17 hat die gleiche Größe wie der C-Faktor (Kim & Kaiser, 1990), wurde aus hungernden Zellen aufgereinigt und zeigt C-Signal-Aktivität (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). In vegetativen Zellen lässt sich nur p25 detektieren, während beide Proteine (p17 und p25) während der Entwicklung nachgewiesen werden können (Kruse, et al., 2001). Antikörper gegen 166 Aminosäuren im C-Terminus von p25 (229 Aminosäuren) blockieren die Entwicklung in Wildtyp-Zellen und erkennen Epitope, die sich auf der Oberfläche von sich entwickelnden Wildtyp-Zellen befinden (Shimkets & Rafiee, 1990).

Es wurde vermutet, dass p25 als Enzym fungiert, welches das C-Signal generiert. p25 zeigt Sequenzhomologien zu Proteinen der Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (SCAD: short-chain alcohol dehydrogenase) (Baker, 1994; Lee et al., 1995). SCAD-Enzyme besitzen zwei konservierte Sequenzmotive, die beide ebenfalls in p25 zu finden sind: ein N-terminales Motiv der NAD(P)⁺-Bindestelle und ein C-terminales konserviertes Motiv des katalytischen Zentrums (Oppermann et al., 2003). Man konnte zeigen, dass p25 *in vitro* NAD⁺ bindet (Lee, et al., 1995). Ein in *E. coli*

produziertes MalE-p25-Fusionsprotein zeigt C-Signal-Aktivität. Das heißt, es kann den Entwicklungsdefekt von *csgA*-Mutanten komplementieren. Diese Eigenschaft geht allerdings verloren, wenn man konservierte Aminosäure-Reste in der NAD(P)⁺-Bindestelle oder der katalytischen Untereinheit gegen andere Aminosäure-Reste austauscht. Zudem verringert sich die Fähigkeit zur Bindung von NAD⁺ in p25 nach Substitutionen in der NAD(P)⁺-Bindestelle (Lee, et al., 1995). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Überproduktion des SocA-Proteins, welches homolog zu SCAD-Enzymen ist, *in vivo* die Entwicklung in *csgA*-Mutanten wiederherstellen kann (Lee & Shimkets, 1994; Lee & Shimkets, 1996). Eine enzymatische Aktivität von p25 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Mit einer biochemischen Zellfraktionierung konnten (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) zeigen, dass sowohl p25 als auch p17 mit der äußeren Zellmembran assoziiert sind. Bei der Reinigung des C-Signals hat man festgestellt, dass die Fraktionen, welche p17 enthalten, eine wesentlich höhere C-Signal-Aktivität nach extrazellulärer Zugabe zu *csgA*-Mutanten aufweisen, als die Fraktionen mit p25. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich bei p17 um das C-Signal handelt. Weiterhin besitzen rekombinante CsgA-Proteine, die dem 18,1 kDa und 17,8 kDa großen C-terminalen Teil von p25 entsprechen, C-Signal-Aktivität. Rekombinantes CsgA-Protein mit einer molekularen Masse von 18,1 kDa ist nicht mehr fähig, *in vitro* NAD⁺ zu binden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass p17 nicht als SCAD-Enzym zur Produktion des C-Signals fungiert. Mit Hilfe eines *in vitro* Protease-Assays konnte man biochemisch zeigen, dass p17 durch N-terminale, proteolytische Spaltung von p25 entsteht. Dafür wurde ein Extrakt von Wildtyp-Zellen, die sich für 9 Stunden im Hungerzustand befanden, mit aufgereinigtem MalE-p25-Fusionsprotein aus *E.coli* inkubiert. Um mehr über die Spezifität der beteiligten Protease zu erfahren, wurde der Protease-Assay wiederholt, zum einen mit Zugabe von *E. coli*-Zellextrakt anstatt von *M. xanthus*-Zellextrakt. Zum anderen wurden in weiteren Ansätzen verschiedene Protease-Inhibitoren zugegeben. p17 konnte bei Zugabe von *E.coli*-Zellextrakt und bei Zugabe von Inhibitoren für Serin-Proteasen nicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Protease, die an der Prozessierung von p25 beteiligt ist, spezifisch für *M. xanthus* ist, und

Ein zentrales Protein des C-Signal-Transduktionsweges ist der DNA bindende Response-Regulator FruA, welcher N-terminal eine Receiver-Domäne und C-terminal eine DNA-Bindedomäne besitzt (Ellehaug et al., 1998; Ogawa et al., 1996). *fruA*-Mutanten sind nicht fähig, Zellwellen zu erzeugen, zu aggregieren und zu sporulieren (Ellehaug, et al., 1998; Horiuchi et al., 2002; Ogawa, et al., 1996). Zudem können sie viele C-Signal-abhängige Gene nicht exprimieren (Sogaard-Andersen & Kaiser, 1996). Die FruA-Aktivität wird transkriptionell und post-translational reguliert. Nach 3 bis 6 Stunden Hungerzustand wird die *fruA*-Transkription induziert. Es wird vermutet, dass mehrere Proteine an dieser Induktion beteiligt sind. Das nach 2 Stunden Hungerzustand aktive A-Signal schaltet durch einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus die *fruA*-Transkription an (Ellehaug, et al., 1998; Ogawa, et al., 1996). Das DevT-Protein, welches vom *devTRS*-Operon kodiert wird und keinerlei Sequenzähnlichkeit zu einem bekannten Protein aufweist, stimuliert direkt oder indirekt die *fruA*-Transkription (Boysen et al., 2002). Letztlich wurde gezeigt, dass das MrpC-Protein, welches homolog zu dem cAMP-Rezeptor-Protein aus *E. coli* ist (Sun & Shi, 2001), direkt an den *fruA*-Promotor bindet und dadurch die Transkription induziert (Ueki & Inouye, 2003). Genetische Daten lassen vermuten, dass die post-translationale Aktivierung von FruA durch die Phosphorylierung eines konservierten Asp-Restes in der N-terminalen Receiver-Domäne erfolgt (Ellehaug, et al., 1998). Die Phosphorylierung erfolgt durch eine, dem C-Signal nachgeschaltete und bisher noch nicht identifizierte Histidin-Proteinkinase (Ellehaug, et al., 1998; Sogaard-Andersen, et al., 1996).

Die dem FruA nachgeschalteten Transduktionswege teilen sich. Ein Weg führt zur Methylierung von FrzCD, wodurch sich das Bewegungsverhalten der Zellen ändert, was schließlich zur Aggregation führt (Sogaard-Andersen & Kaiser, 1996). Dieser Prozess wurde bereits näher beschrieben (siehe 2.2). Der andere Weg, indem FruA als transkriptioneller Regulator agiert, führt letztendlich zur Sporulation. FruA reguliert die Expression des *devTRS*-Operons, sowie der Gene *fdgA* und *Ω4400*. Die DevTRS-Proteine sind neben der oben erwähnten Stimulation der *fruA*-Expression für die Expression eines Sporulationsgens, welches durch die Insertion des Tn5/*lac* Ω7536 markiert ist,

verantwortlich (Licking et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindedomäne von FruA direkt an die Promotor-Regionen von *fdgA* und *Ω4400* bindet. Dies lässt vermuten, dass FruA ein direkter Aktivator der Transkription dieser beiden Gene ist. *fdgA* kodiert für ein Lipoprotein der äußeren Membran, welches im Export von Polysacchariden involviert ist (Ueki & Inouye, 2005).

Ein weiterer Zweig des C-Signal-Transduktionsweges ist dem FruA vorgeschaltet und führt über einen noch nicht identifizierten Mechanismus zu einer erhöhten Transkription des *csgA*-Gens (Kim & Kaiser, 1991). Für den Anstieg der *csgA*-Transkription als Antwort auf den Hungerzustand sind das Protein RelA und die vier Proteine des *act*-Operons (*actABCD*) verantwortlich (Gronewold & Kaiser, 2001).

Drei weitere Zweige des C-Signal-Transduktionsweges werden von den Histidin-Proteinkinasen SdeK, TodK und RodK gebildet (Abb. 5). Man vermutet, dass sie stromabwärts der FruA-Akkumulation und stromaufwärts des Frz-Systems und der Expression von *devTRS* in den Transduktionsweg eingreifen. Kurz nach Eintritt in den Hungerzustand wird die Histidin-Proteinkinase SdeK in Abhängigkeit von dem Protein RelA synthetisiert. Wie genau SdeK allerdings die Aggregation, Sporulation und Genexpression stimuliert, ist noch unbekannt (Garza et al., 1998; Pollack & Singer, 2001). Der Zweig, der durch die Histidin-Proteinkinase TodK bestimmt wird, führt hingegen zur Hemmung der Aggregation, Sporulation und Genexpression (Rasmussen & Sogaard-Andersen, 2003). Die Synthese ist unabhängig von RelA (Rasmussen & Sogaard-Andersen, 2003). Bei SdeK und TodK handelt es sich um cytoplasmatische Proteine, und beide besitzen PAS-Domänen in ihrer Sensor-Region. PAS-Domänen können Änderungen des Redoxpotentials, sowie des Sauerstoff-, Licht- oder Energie-Levels wahrnehmen (Taylor & Zhulin, 1999). Die dritte in den C-Signal-Transduktionsweg eingreifende Histidin-Proteinkinase ist RodK (Rasmussen et al., 2005; Rasmussen et al., 2006). Bei RodK handelt es sich um eine cytoplasmatische Kinase, die strukturell sehr komplex aufgebaut ist. Sie besitzt zusätzlich zur Sensor- und Kinase-Domäne drei C-terminale Receiver-Domänen. Genetische Analysen lassen vermuten, dass RodK einen hemmenden Effekt auf den C-Signal-Transduktionsweg hat.

Ein vierter Zweig des C-Signal-Transduktionsweges stellt das Enhancer-Bindeprotein MXAN4899 dar (Jelsbak et al., 2005) (Abb. 5). MXAN4899 ist wichtig für die Aggregation, Sporulation und die C-Signal-abhängige Genexpression. Genetische Analysen haben gezeigt, dass MXAN4899 stromabwärts der Akkumulation von FruA in den C-Signal-Transduktionsweg eingreift. MXAN4899 besitzt eine N-terminale FHA- (forkhead-associated) Domäne. FHA-Domänen sind in Protein-Protein-Interaktionen involviert und binden vorzugsweise an Phospho-Threonin-Reste ihrer Zielproteine (Li et al., 2000).

2.5 Regulierte Proteolyse und Serin-Proteasen

Regulierte Proteolyse ist essentiell für alle Organismen. Beispielsweise spielt sie eine kritische Rolle beim Ablauf des Zell-Zyklus (Domian et al., 1997) und der Zell-Polarität (Chen et al., 2005; Viollier et al., 2002) in Bakterien, z.B. in *Caulobacter crescentus*. Weiterhin ist regulierte Proteolyse bei der Kompetenz und Sporulation in *Bacillus subtilis* (Msadek et al., 1998), sowie beim Überleben der stationären Phase und bei der Stress-Antwort in *E. coli* (Alba et al., 2002; Lange & Hengge-Aronis, 1994) zu beobachten. In all diesen Fällen ist ein bestimmter Faktor als Antwort auf ein intrazelluläres oder Umwelt-Signal einer kontrollierten und regulierten Proteolyse ausgesetzt.

Die Proteolyse kann räumlich reguliert werden. Ein Beispiel ist die Spaltung von CtrA in *C. crescentus*, bei welcher dieses Protein Zell-Zyklus-abhängig abgebaut wird, nachdem es zusammen mit einer ClpXP-Protease und einem RcdA Adapter-Protein kolokalisiert wurde (McGrath et al., 2006). Ein räumlich regulierter Mechanismus, in welcher Substrat und Protease voneinander getrennt sind und reguliert zusammengebracht werden, steht im Gegensatz zu einem zeitlich regulierten Mechanismus in *C. crescentus*, in welchem die Protease nur bei Bedarf synthetisiert wird. Ein Beispiel ist hier die Protease PerP, die PodJ_L zu PodJ_S abbaut (Chen et al., 2006). Neben der räumlichen und zeitlichen Regulation der Proteolyse kann die Regulation auch durch ein Signal erfolgen. Beispielsweise führt extrazytoplasmatischer Stress in *E. coli* zu einer Spaltung des Anti-Sigmafaktors RseA durch die Protease DegS. Dadurch wird σ^E im Zytoplasma freigesetzt und das σ^E -Regulon somit aktiviert

(Ades et al., 1999). Durch die Bindung der PDZ-Domäne von DegS an ein C-terminales Motiv äußerer Membranproteine wird die proteolytische Kaskade aktiviert (Walsh et al., 2003).

Proteasen sind in Clans und Familien eingeteilt. Clans sind Gruppen von Familien, wo es Beweise für gleiche Abstammung gibt. Familien werden aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften in Unterfamilien eingeteilt. In *M.xanthus* gibt es vier Familien von sekretierten Serin-Proteasen. Zu diesen Familien zählen die HtrA/DegP-ähnlichen Serin-Proteasen, die Rhomboid-ähnlichen Serin-Proteasen, die Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen und die Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen. Die Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen, sowie die Rhomboid-ähnlichen und HtrA/DegP-ähnlichen Serin-Proteasen werden im Ergebnis-Teil ausführlich beschrieben.

Im Folgenden wird etwas ausführlicher auf die Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen der Familie S8 eingegangen. Bis zur Entschlüsselung der Sequenz (Smith et al., 1966) und der Struktur (Wright et al., 1969) von Subtilisin hat man angenommen, dass alle Serin-ähnlichen Proteasen homolog zu Chymotrypsin sind. Aber Subtilisin zeigt klare Unterschiede zu Chymotrypsin. Die S8-Familie, auch bekannt als Subtilase-Familie, ist die zweitgrößte Familie von Serin-Proteasen. Die Subtilase-Familie kann in zwei Unterfamilien eingeteilt werden; zum einen in Subtilisine als Repräsentanten der Unterfamilie S8A, und zum anderen in Kexine als Vertreter der Unterfamilie S8B.

Ein Asp-Rest, ein His-Rest und ein Ser-Rest bilden die katalytische Triade der Mitglieder der S8-Familie. Diese katalytische Triade unterscheidet sich zu katalytischen Triaden von HtrA/DegP- und Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Zudem werden die Reste der katalytischen Triade von speziellen Sequenzmotiven umgeben, die charakteristisch für die jeweiligen Unterfamilien sind. Die S8A-Unterfamilie hat folgende konservierte Sequenzmotive: **Asp**-Thr/Ser-Gly, **His**-Gly-Thr-His und Gly-Thr-**Ser**-Met-Ala-Xaa-Pro. Bei der S8B-Unterfamilie findet man folgende Motive: **Asp**-Asp-Gly, **His**-Gly-Thr-arg und Gly-Thr-**Ser**-Ala/Val-Ala/Ser-Pro. In der katalytischen Triade Asp-His-Ser dieser Proteasen stellt das Serin die „active site“ dar, welche verantwortlich für die Spaltung der Peptid-Bindung ist. Zusätzlich dazu gibt es in den Subtilisinen noch einen konservierten Asn-Rest. Er bildet das oxyanionische Loch und ist

wichtig für die Stabilisierung des Übergangszustandes (Siezen & Leunissen, 1997).

Die Proteasen der Subtilisin Familie werden von typischen Serin-Peptidase-Inhibitoren, wie Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), inhibiert. Kexin indessen ist sowohl gegen PMSF als auch gegen hohe Konzentrationen von DFP resistent (Fuller, 2004), was anfänglich zu einer Fehlidentifikation als Cystein-Peptidase führte. Aufgrund der Tatsache, dass viele Proteasen der S8-Familie zur Stabilisierung Calcium binden, konnte man eine Hemmung auch durch Zugabe von EDTA und EGTA erzeugen, welche als spezielle Inhibitoren für Metallo-Proteasen gelten. Zudem scheint auch das Subtilisin-Prosegment eine hemmende Wirkung aufzuweisen.

In Bakterien, Archaeen und Pilzen sind die Mitglieder der Subtilisin-Familie überwiegend in Ernährungsprozessen involviert. Die meisten Peptidasen dieser Familie werden sekretiert. Die Mehrheit der Subtilisine werden als Prä-Proenzym mit einem N-terminalen Signalpeptid und einem darauffolgenden Prosegment synthetisiert (Siezen & Leunissen, 1997). Üblicherweise ist das Prosegment nicht konserviert (Siezen & Leunissen, 1997) und fungiert als intramolekulares Chaperon (Ohta et al., 1991). Das Prosegment kann durch Autoproteolyse entfernt und die Protease somit aktiviert werden (Ikemura & Inouye, 1988).

In Eukaryoten ist die Proteolyse eines Vorläuferproteins durch eine bestimmte Protease ein allgemein bekannter Prozess, um ein aktives Signalmolekül zu generieren. Viele Pro-Hormone werden durch spezialisierte „proprotein convertases (PPC)“ gespalten und damit aktiviert. Kex2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und Säugetier-Furine gehören zu diesen PPC, welche als subtilisin-ähnliche Proteasen in sekretorischen Signaltransduktionswegen agieren (Siezen & Leunissen, 1997). Kexin ist an der Prozessierung des „alpha-mating factors“ in *S.cerevisiae* beteiligt. Furin ist im Trans-Golgi-Netzwerk und in der Endosomen-Membran von Säugetieren zu finden, wo es eine Vielzahl von Vorläufer-Proteinen spaltet. Die Proteasen der Unterfamilie S8B, wie Kexin und Furin, spalten spezifisch nach dibasischen Aminosäuren.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den meisten Proteasen der Unterfamilie S8A um unspezifische Proteasen, welche überwiegend in Prokaryoten bzw. niederen Eukaryoten vorkommen und vorzugsweise nach hydrophoben Aminosäureresten spalten (Siezen & Leunissen, 1997). Aber auch unter diesen Proteasen gibt es Ausnahmen. Beispiele für spezifische Spaltung sind die Proteine NisP (Kleerebezem & Quadri, 2001) oder SphB1 aus *Bordetella pertussis* (Coutte et al., 2001). NisP ist eine Subtilisin-ähnliche Protease, die an der Prozessierung eines Vorläufers des sekretierten, antibiotischen Peptids Nisin beteiligt ist (Kleerebezem & Quadri, 2001). SphB1 ist ein großes, exportiertes Protein mit einer Subtilisin-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen Domäne, die typisch für bakterielle Autotransporter ist. Dieses Protein ist in der FhaB filamentösen Hämagglutinin Prozessierung in *Bordetella pertussis* involviert (Coutte, et al., 2001).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Entwicklungsprozess von *M. xanthus* lässt sich in zwei morphologische Ereignisse unterteilen: die Aggregation der Zellen zu Fruchtkörpern und die Sporulation der Zellen in den Fruchtkörpern. Diese beiden Ereignisse werden durch p17 induziert und koordiniert (Kim & Kaiser, 1991; Kruse, et al., 2001; Li, et al., 1992). Die Übertragung des C-Signals wird durch einen kontaktabhängigen Mechanismus gewährleistet (Kim & Kaiser, 1990; Kim & Kaiser, 1990). Die beiden morphologischen Antworten werden ab einem bestimmten Schwellenwert induziert, welcher die Zellposition wiedergibt (Kim & Kaiser, 1991; Kruse, et al., 2001; Li, et al., 1992). p17 wird durch proteolytische Spaltung von p25, welches durch das *csgA*-Gen kodiert wird, synthetisiert. Bei der proteolytischen Spaltung wird der 8 kDa große N-Terminus von p25 entfernt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). p25 findet man sowohl in vegetativen als auch in entwickelten Zellen, während p17 ausschließlich in entwickelten Zellen vorkommt (Kruse, et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, die Serin-Protease zu finden, die für die Spaltung von p25 verantwortlich ist. Zur Vereinfachung wird diese Protease von nun an PopC (protease of precursor of the C-signal) genannt. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte gezeigt werden, dass aufgereinigtes p25 durch Zugabe von

Zellextrakt des Wildtyps *in vitro* zu p17 gespalten wird. Zudem kann diese Spaltung durch den Serin-Protease-Inhibitor PMSF gehemmt werden. Weiterhin konnte mit verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass sowohl p25 als auch p17 in der äußeren Membran lokalisiert sind, und dass die Aktivität der Protease während der Entwicklung hoch reguliert wird (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003).

Aufgrund dieser Beobachtungen sollten die Protease-Kandidaten folgende Voraussetzungen erfüllen bzw. folgende Eigenschaften haben: Zum einen wurde nach einer Serin-Protease gesucht, die wahrscheinlich sekretiert wird, um p25 in der äußeren Membran zu spalten. Zum anderen sollte die Aktivität dieser sekretierten Serin-Protease während der Entwicklung hoch reguliert werden. Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden, den Expressionsdaten von DNA-Microarrays, quantitativer real-time PCR und biochemischer Charakterisierung wurde die Zahl möglicher Kandidaten für PopC in *M. xanthus* eingeschränkt. Von den so identifizierten Kandidaten wurden Insertionsmutanten hergestellt, welche in einem Entwicklungsassay auf mögliche Phänotypen untersucht wurden. Erwartet wurde ein Phänotyp in der Entwicklung, der dem Phänotyp einer *csgA*-Mutante entspricht oder ähnelt. Das heißt, die Mutante sollte geringe bis gar keine Aggregation und Sporulation zeigen. Zudem sollte auf Protein-Ebene in einem Western-Blot mit einem *csgA*-Antikörper während der Entwicklung p25, aber nicht p17 nachzuweisen sein.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Antibiotika waren, wenn nicht gesondert im Text angeführt von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Difco (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe) und Sigma Aldrich (Seelze). Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mit dem „PCR-Purification-Kit“ bzw. mit dem „Gel-Extraction-Kit“ von Qiagen (Hilden). Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden die „Mini- und Maxi-Prep-Kits“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Die verwendeten DNA-Marker stammten von der Firma Bioline (Luckenwald). Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo Electron (Ulm), Sigma (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. Die DNA-Sequenzierung wurde zunächst von Agowa (Berlin) und später mit dem 3130 Genetic Analyser von Applied Biosystems im Max-Planck-Institut Abteilung Ökophysiologie (Marburg) durchgeführt. Für DNA-Konzentrationsbestimmungen wurde das Nano-Drop ND-10000 Spectrophotometer verwendet. Elektrophoresegele wurden mit 2UV Transilluminator (UVP BioDoc-IT-System) und dem Videoprintgerät Mitsubishi Electric B93E dokumentiert. Die Koloniemorphologie wurde an dem Leica MZ75 Stereomikroskop beobachtet und fotografiert. Der LWM-Marker von Amersham (Freiburg) und der Prestained Page-Ruler von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) wurden als Proteinmarker verwendet. Die aufgereinigten Proteine wurden für die Immunisierung von Kanichen zu Eurogentec (Seraing, Belgien) versandt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Zentrifugen	SORVALL RC 5B plus	Thermo Electron (Dreieich)
	SORVALL–Ultra Pro 80	
	Multifuge 1 s-R	
	Biofuge fresco	
	Biofuge pico	

PCR-Maschinen	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
	Mastercycler epgradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermo ,mixer	Thermomix compact	Eppendorf (Hamburg)
UV-Tisch	UVT_20 LE	Herolab (Wiesloch)
Ultraschall	Branson Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
SDS-Page Apparatur	Mini-Protean II	Bio-Rad (München)
Elektroporation	Gene Pulser Xcell	Bio-Rad (München)
Elektrotransfer-Apparat	Consort Power Supply E865	Peqlab (Erlangen)

3.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen stammten von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Fermentas (St. Leon-Rot). Als DNA-Polymerasen wurden Platinum[®] Pfx DNA Polymerase von Invitrogen (Karlsruhe) und Eppendorf[®] MasterMix von der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Von der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.) fanden T4-DNA-Ligase und Antarctic Phosphatase[®] Verwendung.

3.3 Medien

Die Medien für *Escherichia coli* wurden wie beschrieben hergestellt (Sambrook et al., 1989). Die Kultivierung der verwendeten Stämme zur Gewinnung von Plasmiden erfolgte aerob auf Luria-Bertani-Medium.

Tabelle 2: Nährmedien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
Luria-Bertani (LB)	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium
	15 g Agar

Sollte das LB-Medium als Selektionsmedium verwendet werden, wurden ihm entsprechende Antibiotika bzw. X-Gal für den Blau-Weiß-Test zugefügt.

Tabelle 3: Zusätze

Zusatz	Endkonzentration	gelöst in
Ampicillin-Natriumsalz	100 µg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	50 µg/ml	100% Ethanol
Gentamycinsulfat	10 µg/ml	H ₂ O
Kanamycinsulfat	100 µg/ml	H ₂ O
Oxytetracyclin-Dihydrat	10 µg/ml	0,1M HCl
X-Gal	40 µg/ml	DMF

Die Kultivierung der *Myxococcus xanthus*-Stämme erfolgte auf 1% CTT-Medium unter Zugabe einer Spurenelementlösung. Da der Stamm DK1622 eine natürliche Resistenz gegenüber Gentamycin trägt, wurde dieses Antibiotikum als Schutz vor Kontamination verwendet.

Tabelle 4: Nährmedien und Zusätze für *M. xanthus*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
1% CTT	10 g Bacto-Casiton
	10 ml 1,0 M Tris-Cl, pH 8,0
	1 ml 1,0 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,6
	10 ml 0,8 M MgSO ₄
	1 ml Spurenelementlösung (1000 x)
1% CTT-Agarplatten	1 % CTT-Medium
	15 g (w/v) Agar
CTT-Soft-Agar	1 % CTT-Medium
	7,5 g (w/v) Agar
CTTYE	1 % CTT-Medium
	2 g (w/v) Hefeextrakt
Spurenelementlösung (1000 x)	15 g Titriplex III
	136 mg (1 mM) ZnCl ₂
	250 mg (1 mM) CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	238 mg (1 mM) CoCl ₂ x 6 H ₂ O

	200 mg (1 mM) Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	200 mg (1 mM) MnSO ₄ x H ₂ O
	2,8 g (10 mM) FeSO ₄ x 7 H ₂ O
	pH 7,0

Für die Entwicklungsstudien von *M. xanthus* benötigt man folgende Medien.

Tabelle 5: Medien für Entwicklungsstudien von *M. xanthus*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
CF-Agarplatten (Hagen et al., 1978; Shimkets & Kaiser, 1982) 24 Stunden vor Gebrauch vorbereiten	15 g Agar
	10 ml 1,0 M Tris-Cl, pH 8,0
	1 ml 1,0 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6
	10 ml 0,8 M MgSO ₄
	nach dem Autoklavieren hinzufügen:
	15 ml 1% CTT-Medium
	5 ml 4% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄
	5 ml 20% (w/v) Na-Pyruvat
	10 ml 20% (w/v) Na-Citrat
TPM-Agarplatten (Kuner & Kaiser, 1982) 24 Stunden vor Gebrauch vorbereiten	15 g Agar
	10 ml 1,0 M Tris-Cl, pH 7,6
	1 ml 1,0 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6
	10 ml 0,8 M MgSO ₄
MC7-Puffer für „Submerged“-Kultur	10 ml 1,0 M MOPS, pH 7,0
	1 ml 1,0 M CaCl ₂

Tabelle 6: Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
Hefe Drop-Out Medium	50 ml 40% Glukose
	6,7 g Yeast N-base w/o aa
	1,6 g DO-supplement -Leu
	oder
	1,84 g DO-supplement -Leu, -Trp
	1,92 g DO-supplement -Trp
	0,6 g DO-supplement -Ade,-His,-Leu,-Trp

YPD (Yeast Peptone Dextrose)	50 ml 40% Glukose
	20 g Difco Pepton
	10 g Hefe-Extrakt
	pH 5,8

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 6 aufgeführten *Myxococcus xanthus* und mit den in Tabelle 7 aufgeführten *Escherichia coli* Stämmen gearbeitet.

Tabelle 7: Verwendete *M. xanthus*-Stämme.

<i>M. xanthus</i> Stämme	Genotyp	Referenz
DK1622	Wildtyp	(Kaiser, 1979)
DK5208	<i>csgA</i> ::TN5-132 ΩLS205	(Kroos & Kaiser, 1987)
DK1217	<i>aglB1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979a; Hodgkin & Kaiser, 1979b)
DK1300	<i>sglG1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979a; Hodgkin & Kaiser, 1979b)
SA1465	<i>fruA</i> ::Tc ^R	(Kruse et al., 2001)
SA1098	<i>attB</i> ::pTK98-10 (zusätzliche Kopien von <i>csgA</i>)	(Kruse, et al., 2001)
SA2305	DK1622::pAB-10, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2306	DK1622::pAB-10, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2307	DK1622::pAB-7, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2308	DK1622::pAB-7, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2309	DK1622::pAB-5, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2310	DK1622::pAB-5, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2311	DK1622::pAB-1, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2312	DK1622::pAB-1, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2313	DK1622::pAB-3, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2314	DK1622::pAB-3, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit

SA2315	DK1622::pAB-2, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2316	DK1622::pAB-2, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2317	DK1622::pAB-11, Km ^R	diese Arbeit
SA2318	DK1622::pAB-8, Km ^R	diese Arbeit
SA2319	DK1622::pAB-9, Km ^R	diese Arbeit
SA2320	DK1622::pAB-4, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2321	DK1622::pAB-11, Km ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2327	SA2314, <i>attB</i> ::pAB-25, Km ^R , Tc ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2328	SA2314, <i>attB</i> ::pAB-25, Km ^R , Tc ^R , Klon 2	diese Arbeit
SA2329	SA2314, <i>attB</i> ::pAB-26, Km ^R , Tc ^R , Klon 1	diese Arbeit
SA2330	SA2314, <i>attB</i> ::pAB-26, Km ^R , Tc ^R , Klon 2	diese Arbeit

Tabelle 8: Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> Stämme	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B -m _B) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen/Merck (Darmstadt)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galk</i> , <i>rpsL</i> <i>strR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Rosetta 2(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B -m _B) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2(Cm ^R)	Novagen/Merck (Darmstadt)
Rosetta-gami 2(DE3)	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> PvuII <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> (DE3) F ⁺ [<i>lac⁺</i> <i>lacI^f</i> <i>pro</i>] <i>gor522</i> ::Tn 10 <i>trxB</i> pRARE2 (Cm ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen/Merck (Darmstadt)

AB-1	pAB-1 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-2	pAB-2 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-3	pAB-3 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-4	pAB-4 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-5	pAB-5 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-6	pAB-6 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-7	pAB-7 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-8	pAB-8 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-9	pAB-9 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-10	pAB-10 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-11	pAB-11 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-12	pAB-12 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-13	pAB-13 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-14	pAB-14 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-15	pAB-15 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-16	pAB-16 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-17	pAB-17 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-18	pAB-18 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-21	pET-45b(+) in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-22	pSWU30 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-23	pBluescript II SK- in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-24	pAB-24 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
AB-25	pAB-25 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-26	pAB-26 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-27	pAB-27 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
AB-28	pAB-27 in <i>E.coli</i> Rosetta-gami 2(DE3)	diese Arbeit

AB-29	pBul80 in <i>E. coli</i> BL21	diese Arbeit
AB-30	pACYC184 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-31	pAB-31 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-32	pAB-32 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-33	pAB-32 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
AB-34	pAB-34 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-35	pAB-34 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
AB-36	pAB-36 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
AB-37	pGAD-T7 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-38	pGBK-T7 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-39	pAB-39 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-40	pAB-40 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-41	pAB-41 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-42	pAB-42 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-43	pAB-43 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-44	pAB-44 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-45	pAB-45 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-46	pAB-46 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-47	pAB-47 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-48	pAB-48 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-49	pAB-49 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-50	pAB-50 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-51	pAB-51 in <i>E.coli</i> TOP10	diese Arbeit
AB-52	pAB-51 in <i>E.coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit

Tabelle 9: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

<i>S. cerevisiae</i> Stämme	Genotyp	Referenz
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} - HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} - ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} MEL1 _{TATA} -lacZ	(James et al., 1996)

3.4.2 Kultivierung der Bakterien

Die verwendeten Medien, Lösungen und Kunststoff-Laborgeräte wurden mittels feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen (Antibiotika, Spurenelementlösung) wurden mit Sterilfiltern (0,22 bzw. 0,45 µm Porendurchmesser) der Firma Millipore (Schwalbach) sterilisiert und nach dem Abkühlen der Medien hinzugegeben. Hitzeunempfindliche Laborgeräte (Glaskolben, Metall, Keramik) wurden im Sterilisationsschrank 3 Stunden bei 180°C sterilisiert.

Die *M. xanthus*-Kulturen wurden aerob bei 32°C auf 1% CTT-Medium im Dunkeln gezüchtet. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf horizontalen Kreisschütteltischen bei 230 rpm bis zu einer bestimmten optischen Zelldichte kultiviert. Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden aerob bei 37°C auf Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) kultiviert. *E. coli* Flüssigkulturen wurden auf dem Schüttler bei 200-220 rpm inkubiert. Die optische Zelldichte der Bakterienkulturen wurden photometrisch durch Absorptionsmessung an einem Photometer (Ultrospec 3100) bestimmt. Die Absorptionsmessung der *M. xanthus*-Kulturen erfolgte bei 550 nm. Bei *E. coli*-Kulturen erfolgte die Messung bei 450 nm (Herstellung chemischer kompetenter Zellen) bzw. 600 nm (Proteinüberexpression).

Für das Animpfen von *M. xanthus*-Flüssigkulturen wurde zunächst eine Einzelkolonie in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 1% CTT-Medium resuspendiert und anschließend wurde dieser Milliliter in einen Erlenmeyerkolben mit 1% CTT-Medium überführt. *E. coli*-Flüssigkulturen wurden direkt mit einer Einzelkolonie angeimpft.

Die verwendeten *S. cerevisiae* Medien wurden, wie in Tabelle 6 beschrieben, hergestellt. Hefekulturen wurden in YPD-Flüssigmedium oder Drop-Out Medium für 16 Stunden bei 30°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Als Festmedium wurde das entsprechende Medium mit Agar komplettiert.

3.4.3 Lagerung transformierter *M. xanthus*- und *E. coli*-Stämme

Kulturen transformierter *M. xanthus* und *E. coli* Stämme wurden maximal vier Wochen auf den entsprechenden Festmedien bei 18°C bzw. 4°C aufbewahrt. Die Lagerung der *M. xanthus* Stämme bei –80°C erfolgte nach Zugabe einer 10 M Glycerinlösung in 1 ml frische Bakterienkultur (0,5 M Glycerinendkonzentration), welche eine OD₅₅₀ > 1 hatte. *E. coli* Stämme wurden ebenfalls bei –80°C gelagert nach Zugabe von Glycerin in 1 ml gut bewachsene Bakterienkultur (2 M Glycerinendkonzentration).

3.4.4 Kultivierung von *M. xanthus* für Entwicklungszyklus

Die *M. xanthus* Stämme wurden auf eine OD₅₅₀ von 0,5 – 0,9 kultiviert. Die Zellernte erfolgte bei 10000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Das Zellpellet wurde in MC7 Puffer (siehe Tabelle 5) auf eine kalkulierte OD₅₅₀ von 7,0 resuspendiert. Für die photographische Dokumentation der Fruchtkörperbildung wurden CF Platten nach (Shimkets & Kaiser, 1982), oder TPM Platten nach (Kuner & Kaiser, 1982) benutzt. Auf die TPM und CF Platten wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension getropft und auf der Laborbank getrocknet. Für die „submerged“ Kulturen wurden 350 µl MC7 Puffer in eine Mikrotiter Platte gegeben und dazu 50 µl Zelllösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 32°C. Die Aggregation und Fruchtkörperbildung auf den TPM und CF Platten wurde im Stereomikroskop (Leica MZ75, Leica, Herrbrugg) bei einer 12,5x und 25x Vergrößerung photographisch mit der Kamera Leica DFC280 dokumentiert. Die „submerged“ Kulturen wurden mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRE2 (Leica, Herrbrugg) und der Kamera Leica DFC350 FX dokumentiert. Fotos wurden in der Regel nach 24 h, 48 h, 72 h und 120 h gemacht.

Für die Gewinnung von Proteinproben aus den sich entwickelnden Zellen wurden „submerged“ Kulturen in den Mikrotiter Platten angesetzt, wie bereits

oben beschrieben. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Well geerntet. Nach dem Ernten wurde das Well noch einmal mit 400 µl MC7 Puffer gewaschen, um sicher zu stellen, dass man alle Zellen aufgenommen hatte. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert bis man alle Proben gesammelt hatte. Dann wurden die Proben in 50 µl Tris/Tricine-SDS-Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren (50 mM Tris/HCl; 4% SDS; 12% Glycerin; 0,005% Bromphenolblau; pH 6,8; 2% β-Mercaptoethanol; 5 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin; 0,6 mM Phenylmethylsulfonylfourid) aufgenommen, bei 96°C aufgeköcht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe 1.6.6) aufgetragen.

3.4.5 Bestimmung der Sporulationseffizienz von *M. xanthus*-Stämmen

Um Die Sporulationseffizienz von *M. xanthus* zu bestimmen, wurden Zellen vegetativ kultiviert und anschließend wie oben beschrieben auf TPM- und CF-Agar, sowie in Flüssigkultur für 120 Stunden entwickelt. Es wurden die Zellen aus 5 Tropfen zu jeweils 20 µl von den Agarplatten bzw. aus den 2 Wells der Flüssigkultur-Ansätze vollständig geerntet und in 800 µl TPM-Puffer aufgenommen. Es erfolgte ein Ultraschall-Aufschluß mit einem Branson Sonifier 250 der Firma Heinemann (Schwäbisch Gmünd) bei 20 kHz und 30 W für 15 Sekunden. Die Zellen wurden dabei auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C für 2 Stunden inkubiert, um danach in 10er-Schritten mit TPM- bzw. MC7-Puffer verdünnt zu werden. Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 µl auf CTT-Platten getropft und bei 32°C inkubiert. Die Platten wurden regelmäßig überprüft, und die Kolonien der entsprechenden Verdünnungsstufen wurden ausgezählt. Eine OD₅₅₀ von 0,7 entspricht ungefähr 5×10^8 Zellen pro ml. Da jede Kolonie aus einer Spore hervorging, konnte somit die Anzahl der Sporen in den entwickelten und geernteten Zellen berechnet werden, wobei die Sporulationseffizienz des Wildtyps immer als Referenz genommen wurde und somit 100% betrug.

3.4.6 Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von *M. xanthus*-Stämmen

Um das S- und A-Bewegungssystem in *M. xanthus* nach Hodgkin und Kaiser (Hodgkin & Kaiser, 1979a; Hodgkin & Kaiser, 1979b) zur untersuchen,

wurden 20 mL 0,5% CTT Agarplatten mit 0,5% Agar und 1,5% Agar angefertigt. Die Platten wurden 24 Stunden vor Versuch gegossen, über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und vor Benutzung 20min bei 32°C „kopfüber“ inkubiert. Die zu prüfenden *M. xanthus* Stämme wurden über Nacht in 1%CTT Medium ohne Antibiotikum bis zu einer OD₅₅₀=0,5-0,9 kultiviert und 10 min bei 4700 rpm Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1%CTT auf eine OD₅₅₀=7 eingestellt. Von dieser Kultur wurden je 2x5 µl auf die vorher beschriebenen Platten getropft. Die Platten wurden aufrecht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 32°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Phänotypen mit dem Stereomikroskop Leica MZ75 bei einer 8- und 25- fachen Vergrößerung betrachtet und mit der Kamera Leica DFC280 und der IM50 Software von Leica dokumentiert. Eine weitere Dokumentation erfolgte nach 48 Stunden.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide

In den Versuchen dieser Arbeit wurden verschiedene synthetische Oligonukleotide, Plasmide und Vektoren verwendet. Diese sind in den Tabellen 9 und 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide. Die Schnittstellen in den Oligonukleotiden sind **magenta-farben**. Die Stopcodons sind durch **blaue** Schrift, Aminosäureaustausche sind in **roter** Schrift gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'- Richtung
ORF08499 for	ATCGG TCTAGATGATAG CTTCGACACGGAGCTGCG
ORF08499 rev	TAGCC AAGCTT CTTCGGACG GGC GGCGAAGAC
ORF06454 for	ATCGG TCTAGATGATAG GGCGTCATGCTGGGCATC
ORF06454 rev	TAGCC AAGCTT GCGCTGCCAT GGC CGTGCCAC
ORF02924 for	ATCGG TCTAGATGATAG GGATGATCGACATGCCCAA G
ORF02924 rev	TAGCC AAGCTT CGTGGCCAT GGC GGTGCCCTG

ORF07049 for	ATCGGTCTAGATGATAGCGGAGCAGGGCGCCAAG
ORF07049 rev	TAGCCAAGCTTCGCGGCCATTGCGGTGCCGG
ORF06912 for	ATCGGTCTAGATGATAGGGCGAACATCGTGTGCTG
ORF06912 rev	TAGCCAAGCTTCGTGCGCCATTGCGGTGCCCCG
ORF05960 for	ATCGGTCTAGATGATAGCCGTGTTGACGGCGGC
ORF05960 rev	TAGCCAAGCTTGGTGGCCATTGCGGTGCCGC
ORF05545 for	ATCGGTCTAGATGATAGCTCGACAGCGGCATCGTTC
ORF05545 rev	TAGCCAAGCTTGCCGCCATGGCGGTGCCCTG
ORFA00613 for	ATCGGTCTAGATGATAGCCTTGCGGCCAGGGGC
ORFA00613 rev	TAGCCAAGCTTGGACGCGCTTGGGTGCCGC
ORF04938 for	ATCGGTCTAGATGATAGCGGATGGACCAGCGCAAG
ORF04938 rev	TAGCCAAGCTTGGTGGCCATTGCGGTGCCGC
ORF00455 for	ATCGGTCTAGATGATAGGCGTGACCAGGAGGACC
ORF00455 rev	TAGCCAAGCTTGGGTGGCCATTGCGGTACCGG
ORF04771 for	ATCGGTCTAGATGATAGGAGGAGCAGGCGGAGTCG
ORF04771 rev	TAGCCAAGCTTGGACCACCGGCGTCCGCTG
ORF01763 for	ATCGGTCTAGATGATAGGGAGATTGTGGGAGGAATC G
ORF01763 rev	TAGCCAAGCTTGGTCCTCCGGCGTCCCCTTGG
ORF08597 for	ATCGGTCTAGATGATAGCGTTGCTGCTGACGGCATG
ORF08597 rev	TAGCCAAGCTTGGCGCGCCTGCGTCTCCCG
ORF00479 for	ATCGGTCTAGATGATAGCAGGCGATTGTGGGAGGG
ORF00479 rev	TAGCCAAGCTTGGCCCTCCGGCGTCCCCCTG
ORF00436 for	ATCGGTCTAGATGATAGCAGGCGATTGTGGGAGGG
ORF00436 rev	TAGCCAAGCTTGGCCCTCCGGCGTCCCCCTG
ORFA01188 for	ATCGGTCTAGATGATAGGGAATCCTGCTGGCGGC
ORFA01188 rev	TAGCCAAGCTTGGGCCACCGGCGTCCCCGC
ORF06035 for	ATCGGTCTAGAGTCGCGGCCTGCGGCC
ORF06035 rev1	GCGTGCTGGCTATCAAGGTGACATT

ORF06035 rev2	TAGCC AAGCTT CCCGAGCC GGC GTTGCCACC
ORF00917 for	ATCGG TCTAGAC GGCGTGCTGCTCTGTTC
ORF00917 rev1	GCTCGTGT CCTATCA CGCGACGTC
ORF00917 rev2	TAGCC AAGCTT CCCGACCC GGC GTTGCCTCC
ORF00406 for	ATCGG TCTAGAC TGGACCAGAACGTCCAGG
ORF00406 rev1	CGCGCAGG CCTATCA GCGGGCTC
ORF00406 rev2	TAGCC AAGCTT GAGCCGCC TGC GTCGCCGC
ORF02081 for	ATCGG TCTAGAC GCCTTCATCCTCGCAGC
ORF02081 rev1	GAAGAAGGCC CCTATCA ATGGACGAG
ORF02081 rev2	TAGCC AAGCTT GGGCCGCC GGC CATGCCCG
β-Gal for	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG
β-Gal rev	GAGCGGATAACAATTTACAC
8597 insertion for	GGGACGCGGGCTGGAGG
8597 insertion rev	CCCCTTCGCGACAGTTGTG
613 insertion for	GAGAGCAACCAGGGCTACC
613 insertion rev	GCATCTGCGTGCTGGTCAG
7049 insertion for	GTGCTGGACATCCACGGC
7049 insertion rev	GACAACAGGGCGTGTTTGAC
8499 insertion for	CAACAACAACGTCCGCGATG
8499 insertion rev	CGCGTCAGGTCACCGTTG
5951 insertion for	GATTCCCATCAGCGACGAC
5951 insertion rev	GAACAGCTTGATGAGCGCC
5396 insertion for	GGAACCCACGCCATGATGC
5396 insertion rev	CGCCCGCGAAGCCGAAG
0047 insertion for	CTTTCTCCCGAGGAAGAGG
0047 insertion rev	CCAGGAAGACGCCGGCC
1345 insertion for	CATTCTCGATGCACCCTCC
1345 insertion rev	GAGGAAGCCGCCCAGATG
4771 insertion for	GTCAGTGAAGGTCATGCGG

4771 insertion rev	CCAGCTCTCGAAGTACGAC
436 insertion for	CATTGCGCTTCGTGAGTGG
436 insertion rev	GCCTCACGCAGCCCACG
6454 insertion for	CAACCCGGACCGCGCAAC
6454 insertion rev	CAAATCCCTCACCTCGAGC
4938 insertion for	CAGTGGACTACGTGCAAGAG
4938 insertion rev	GCGACCGTCTCGGGCTTC
455 insertion for	CGTGGCCTTCATCGAGCAG
455 insertion rev	GAGCGCGTCCATCACCTG
6912 insertion for	CGTCGCTGCTGATCGCCC
6912 insertion rev	GTCTCGAGCAGGGCATTGC
479 insertion for	GATGTGGTGGTCCGGAGC
479 insertion rev	CACCAGGCAAGCCCGGC
1763 insertion for	CATGAGCGGAGTGGTCGTC
1763 insertion rev	CGTATAGATGCCGGGCAAC
1188 insertion rev	GCAGGAGAGGTCACCAAAC
2924 insertion for	GCCAGTTTCACGCCGAACG
2924 insertion rev	CCGGCCGCGTAGAGCATC
5960 insertion for	CACCCTGAAGAGCTGGAGC
5960 insertion rev	GGTTTTCGGCGAACATCAGC
6035 insertion for	CGCAGAAAGCTGTTCGGCG
6035 insertion rev	GGTTCACGACGTTGCAGCC
6454 for complementation (<i>Xba</i> I)	ATCGG TCTAG ACGGAGGGATGTGGGCG
6454 rev compl./overexpr. (<i>Hind</i> III)	TAGCC AAGCTT ACCGCCACCGTCACCTGA
6454 for overexpresssion (<i>Bam</i> HI)	ATCGG GGATCC CATGAAGTCCTACCTGTTGG
6454 ASM Ser→Ala for	GAGTGGCACGGCCATGGCAGC

6454 ASM <i>Pst</i> I over for	ATCGG CTGCAG ACGATGATTCTGTCG
6454 ASM <i>Nco</i> I com for	ATCGG CCATGG CTCACTTCTACGAA
6454 ASM <i>Pst</i> I over for new	GCGCG CTGCAG ACGATGATTCTGTCG
6454 ASM <i>Nco</i> I com for new	TGCCA CCATGG CTCACTTCTACGAA
6454 C-term for II	CGGCATCTCGGAGGCGG
6454 C-term rev II (<i>Hind</i> III ohne Stop)	TAGCC AAGCTT CCTGAATACGGCCAGGCC
6454 C-term for (<i>Nde</i> I)	ATCGG CATATGA AGTCCTACCTGTTGGTTCC
6454 C-term rev (<i>Not</i> I)	TAGCC GCGGCCGC CCTGAATACGGCCAGGCC
6454 C-term prosegment rev (<i>Hind</i> III ohne Stop)	TAGCC AAGCTT GCGCTCGGCCAGCGAGG
6454 C-term peptidase for (<i>Bam</i> HI)	ATCGG GGATCC GAGTGGCCCGACGAGTG
A MXAN0207 <i>Hind</i> III for	AAGCTT TGATGCCGCCGCCCGGCATCTC
B MXAN0207 rev	CGTGCCCGCCCGGCGCTCCCATGGCGCCGA
C MXAN0207 for	GAGCGCCGGGCGGGCACGATGATGCCCTC
D MXAN0207 <i>Xba</i> I rev	TCTAGAC GTGCGCCAGTTGCATGGATGGAC
E MXAN0207 for	GCGCGCGTCATCCAGTTC
F MXAN0207 rev	GGTGGGACAGGCTGCCC
G MXAN0207 for	CCCGGGAGAGGATGAGGG
H MXAN0207 rev	CGAACTCCGGGGCACGGC
Overexpr. MXAN0207 for (<i>Bam</i> HI)	ATCGG GGATCC CATGAGGGCCATGAGCAGG
Overexpr. MXAN0207 rev (<i>Hind</i> III)	TAGCC AAGCTT GATGAGGTCGAGGGGCATC
Y2H PopC full-length for	ATCGG CATATGA AGTCCTACCTGTTGGTTC
Y2H PopC full-length rev	ATCGG GAATTC TTATCACCTGAATACGGCCAGG
Y2H peptidase for	ATCGG CATATG GAGTGGCCCGACGAGTGC
Y2H peptidase rev	ATCGG GAATTC TTATCAGCCCTTGCCTGTCTTGTGC

Y2H prosegment for	ATCGG CATATG AAGTCCTACCTGTTGGTTC
Y2H prosegment rev	ATCGG GAATTC TTATCAGCGCTCGGCCAGCGAGG
Y2H p25 for	ATCGG CATATG CGCTACGTCATCACCG
Y2H p25 rev	ATCGG GGATCC TTACTACCAGGGCACTTCGGTC
Y2H p17 for	ATCGG CATATG AGCGTGCGCGCGTTCCG
Y2H p17 rev	ATCGG GAATTC TTACTACCAGGGCACTTCGGTC
Y2H MXAN0207 for	ATCGG CATATG AGGGCCATGAGCAGG
Y2H MXAN0207 rev	ATCGG GAATTC TTACTAGATGAGGTCGAGGGG
Oligonukleotide für Sequenzierung	
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGA
pET-45 up 2	TGGCGCCGGTGATGCCGGCC
pET-45 down	ATCCGGATATAGTTCCTCCT
Seq LacZ for	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG
Seq LacZ rev	GACCATGATTACGAATTCGAGCTCGG
Seq 6454 for	CGGTACATGCCGCTCATCGGTGC
Seq 6454 rev	GCACTCGTCGGGCCACTCGC
Seq 6454 for new	GCCCGTCAGTGGACAGGAAGAG
Sequenz 6454 ASM for	GAACGACGCGGCCCGC
Sequenz 6454 ASM rev	GGAAAGCGGCTGGATAACC
Oligonukleotide für RT-PCR	
ORF04771-603F	TGAGTACATTGCCCCGGATC
ORF04771-693R	GTGATTGACGGTGAGCGGAC
ORF04938-122F	AGCAGACCGGCAAGTTCATC
ORF04938-212R	ACCTGTTCCAGGCTTTGTGC
ORFA00613-833F	GCACCCAGTACACCGACCA

ORFA00613-923R	CCCGTCACGCCATAGGC
ORF06912-486F	GCGCGCCAACAAGGTCT
ORF06912-576R	GTCGATGACGCACACCTTGAT
ORF07049-1126F	TCCACGGTGGACGTACGG
ORF07049-1216R	CGCAATCCACCAGCTTGC
ORF08499-909F	CAACGCCGTGCAGTACGTC
ORF08499-1006R	CTAGGCCTTCGAGGTAGGTCG
ORF00479-461F	TCGACAAGCCCATCAAGTTCA
ORF00479-551R	CTCTTGCCGCACGAAGTACC
ORF05960-1182F	GAAGATCATGAGCCTGGGTGG
ORF05960-1281R	GCCGTGCTCGGTCTTCATC
MXAN0206-803F	CCGTTATCGAATCGGAGACC
MXAN0206-873R	GTGCAGCAGCCACTCCATG
MXAN0207-280F	GAAAGCGCGCAGTTCCAC
MXAN0207-339R	GCCCAGGAGATGGTGTGC

Tabelle 11: Verwendete Plasmide und Vektoren. Die Nummer jedes Plasmids stimmt mit der laufenden Nummer des entsprechenden *E. coli*-Stammes in den gentechnischen Aufzeichnungen überein.

Bezeichnung	Genotyp/Beschreibung	Referenz
pBluescript II SK-	Klonierungsvektor, Blau/weiß-Selektion, Amp ^R	Fermentas, (St. Leon-Rot)
pBGS18	Klonierungsvektor, Blau/weiß-Selektion, Kan ^R	(Spratt et al., 1986)
pET-24	Expressionsplasmid, T7-Promotor, His ₆ -Tag (C-terminal), T7-Tag (N-terminal), Kan ^R	Novagen/Merck (Darmstadt)
pET-45b(+)	Expressionsplasmid, T7-Promotor, His ₆ -Tag (N-terminal), S-Tag (C-	Novagen/Merck (Darmstadt)

	terminal), Enterokinase Protease Stelle, Amp ^R	
pSWU30	pBGS18 (Spratt et al., 1986) Derivat, <i>Mx8 attP</i> , Tet ^R	(S. Wu, 1997)
pGAD-T7	LEU2 Amp ^R Hefvektor (leer) für Y2H	Clontech (Heidelberg)
pGBK-T7	TRP1, Kan ^R Hefvektor (leer) für Y2H	Clontech (Heidelberg)
pGAD-T7-T	LEU2 Amp ^R Positivkontrolle für Y2H	Clontech (Heidelberg)
pBK-T7-53	TRP1, Kan ^R Positivkontrolle für Y2H	Clontech (Heidelberg)
pBK-T7-Lam	TRP1, Kan ^R Negativkontrolle für Y2H	Clontech (Heidelberg)
pBul80	<i>csgA</i> in pMal-c2	(Lee et al., 1995)
pACYC184	“Low copy”-Plasmid mit dem Replikationssystem des Miniplasmids p15A	(Rose, 1988)
pBJ114	pUC119 mit Km ^r und <i>galK</i> ; abgeleitet von pKG2	(Wu & Kaiser, 1996)
pAB-1	ORFA00613 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-2	ORF08499 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-3	ORF06454 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-4	ORF07049 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-5	ORF00455 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-6	ORF01188 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-7	ORF04771 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-8	ORF04938 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> -	diese Arbeit

	<i>HindIII</i>) in pBGS18	
pAB-9	ORF06912 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-10	ORF08597 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-11	ORF01763 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAb-12	ORF00436 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-13	ORF00479 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-14	ORF02081 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-15	ORF05960 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-16	ORF06035 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-17	ORF00917 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-18	ORF02924 aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pBGS18	diese Arbeit
pAB-24	ORF06454 aus <i>M. xanthus</i> (<i>BamHI</i> - <i>HindIII</i>) in pET-45b(+)	diese Arbeit
pAB-25	ORF06454 (Promotor-Region von 600 bp und Gen) aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pSWU30	diese Arbeit
pAB-26	ORF06454 (Promotor-Region von 600 bp und Gen mit Mutation in der „active-site“ S423A) aus <i>M. xanthus</i> (<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i>) in pSWU30	diese Arbeit
pAB-27	ORF06454 aus <i>M. xanthus</i> (<i>BamHI</i> - <i>HindIII</i>) in pET-24b(+)	diese Arbeit

pAB-31	pAB-27 (SphI-HindIII) in pACYC184	diese Arbeit
pAB-32	Peptidase-Domäne von PopC (<i>BamHI-HindIII</i>) in pET-24b(+)	diese Arbeit
pAB-34	Prosegment von PopC (<i>BamHI-HindIII</i>) in pET-24b(+)	diese Arbeit
pAB-36	ORF06454 (Gen mit Mutation in der „active-site“ S423A) aus <i>M. xanthus</i> (<i>BamHI-HindIII</i>) in pET-24b(+)	diese Arbeit
pAB-39	Prosegment von PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-40	Prosegment von PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-41	Peptidase-Domäne von PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-42	Peptidase-Domäne von PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-43	p17 (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-44	p17 (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-45	p25 (<i>NdeI-BamHI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-46	p25 (<i>NdeI-BamHI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-47	PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-48	PopC (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-49	MXAN0207 (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGAD-T7	diese Arbeit
pAB-50	MXAN0207 (<i>NdeI-EcoRI</i>) in pGBK-T7	diese Arbeit
pAB-51	MXAN0207 aus <i>M. xanthus</i> (<i>BamHI-HindIII</i>) in pET-24b(+)	diese Arbeit

3.5.2 Herstellung der Plasmidkonstrukte

In den folgenden Abschnitten werden die Klonierungsstrategien der wichtigsten und meist verwendeten Plasmide beschrieben.

pAB-25: Zur Herstellung von pAB-25 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 6454 for complementation (*Xba*I) und 6454 rev compl./overexpr. (*Hind*III) durchgeführt, die das komplette Gen *MXAN0206* und zusätzlich die Promotorregion amplifiziert (Abb. 13A). Dieses PCR-Produkt und der Zielvektor pSWU30 wurden mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III verdaut. Der Vektor pSWU30 wurde zudem noch dephosphoryliert. Dann wurde der Vektor mit dem Fragment ligiert, so dass das Plasmid pAB-25 (Abb. 13B) entsteht. Das PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

pAB-26: Zur Herstellung von pAB-26 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 6454 ASM Ser→Ala for und 6454 rev compl./overexpr. (*Hind*III) durchgeführt. Der dadurch entstandene "Megaprimer" wurde wiederum in einer PCR mit dem Oligonukleotid 6454 ASM *Nco*I verwendet. Das resultierende PCR-Produkt und der Zielvektor pAB-25 (siehe 4.2.2 und oben) wurden mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III verdaut. Der Vektor pAB-25 wurde zudem noch dephosphoryliert. Dann wurde der Vektor mit dem Fragment ligiert, so dass das Plasmid pAB-26 (Abb. 16C) entsteht. Das PCR-Produkt durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

pAB-27: Zur Herstellung von pAB-27 wurde mit PCR unter Verwendung der Oligonukleotide 6454 for overexpression (*Bam*HI) und 6454 C-term revII (*Hind*III ohne Stop) das komplette Gen *MXAN0206*, allerdings ohne Stopcodon, amplifiziert. Dieses PCR-Produkt und der Zielvektor pET-24b(+) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Der Vektor pET-24b(+) wurde zudem noch dephosphoryliert bevor die Ligation mit dem Fragment durchgeführt wurde. Das dadurch entstandene Plasmid pAB-27 (Abb. 19A) wurde durch Sequenzierung auf die Richtigkeit des Inserts überprüft.

pAB-32: Zur Konstruktion von pAB-32 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 6454 C-term peptidase for (*Bam*HI) und 6454 C-term revII (*Hind*III ohne Stop) gemacht. Diese PCR amplifiziert die Peptidase Domäne von

MXAN0206 allerdings ohne Stopcodon. Das PCR-Produkt und der Zielvektor pET-24b(+) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Der Vektor pET-24b(+) wurde zudem noch dephosphoryliert bevor die Ligation mit dem Fragment durchgeführt wurde. Das dadurch entstandene Plasmid pAB-32 (Abb. 31A) wurde durch Sequenzierung auf die Richtigkeit des Inserts überprüft.

pAB-34: Zur Konstruktion von pAB-34 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 6454 for overexpression (*Bam*HI) und 6454 C-term prosegment rev (*Hind*III ohne Stop) gemacht. Diese PCR amplifiziert die N-terminale Verlängerung von MXAN0206. Das PCR-Produkt und der Zielvektor pET-24b(+) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Der Vektor pET-24b(+) wurde zudem noch dephosphoryliert bevor die Ligation mit dem Fragment durchgeführt wurde. Das dadurch entstandene Plasmid pAB-34 (Abb. 32A) wurde durch Sequenzierung auf die Richtigkeit des Inserts überprüft.

pAB-36: Zur Herstellung von pAB-36 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 6454 ASM Ser→Ala for und 6454 rev compl./overexpr. (*Hind*III) durchgeführt. Der dadurch entstandene "Megaprimer" wurde wiederum in einer PCR mit dem Oligonukleotid 6454 for overexpression (*Bam*HI) verwendet. Das resultierende PCR-Produkt und der Zielvektor pET-24b(+) wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Der Vektor pET-24b(+) wurde zudem noch dephosphoryliert. Dann wurde der Vektor mit dem Fragment ligiert, so dass das Plasmid pAB-36 entsteht. Das PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

pAB-51: Zur Konstruktion von pAB-51 wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Overexpr. MXAN0207 for (*Bam*HI) und Overexpr. MXAN0207 rev (*Hind*III) eine PCR durchgeführt, die das komplette Gen *MXAN0207* ohne Stopcodon amplifiziert. Dieses PCR-Produkt und der Zielvektor pET-24b(+) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Der Vektor pET-24b(+) wurde zudem noch dephosphoryliert bevor die Ligation mit dem Fragment stattfand. Das dadurch entstandene Plasmid pAB-51 (Abb. 26A) wurde durch Sequenzierung auf die Richtigkeit des Inserts überprüft.

3.5.3 Herstellung von Insertionsmutanten von *M. xanthus*

Um die Funktion der acht ausgewählten Proteasen in *M. xanthus* zu untersuchen, wurden Insertionsmutanten, wie in Abbildung 6 gezeigt, konstruiert. Dafür wurde mittels PCR jeweils ein zentrales, mindestens 500 bp langes Stück des Gens amplifiziert. Die Größe des Fragments von mindestens 500 bp ist wichtig, damit das Insertionskonstrukt durch homologe Rekombination in den Genort integrieren kann. Das durch die Klonierung entstandene Plasmid trägt außer dem Fragment des Zielgens noch ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Das Plasmid wurde wie in 3.5.8 beschrieben in den Wildtyp von *M. xanthus* transformiert. Da das Plasmid pBGS18 in *M. xanthus* nicht repliziert wird, bleibt die Resistenz nur erhalten, wenn das Plasmid in das Genom integriert, was durch homologe Rekombination ins Zielgen erfolgt. Transformanten werden nach ungefähr einer Woche vereinzelt, in Reinkultur genommen, und deren Genotyp durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden auf das Fragment des Zielgens bzw. auf den Vektor pBGS18 überprüft. Es wurden die Phänotypen von mindestens zwei verifizierten Klonen pro Mutante in der Entwicklung getestet.

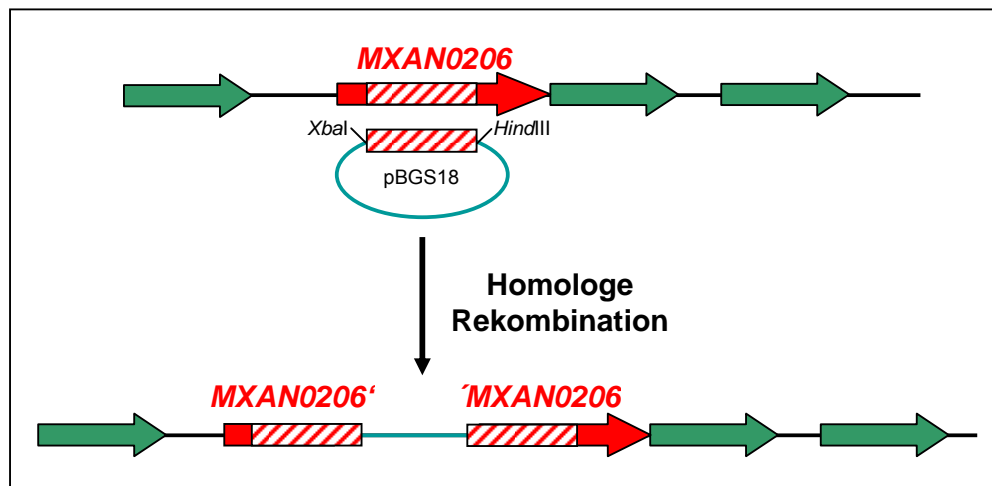


Abbildung 6: Schema zur Konstruktion von Insertionsmutanten. Ein zentraler Teil des Zielgens wird mittels PCR amplifiziert. Dabei werden an den Enden des Fragments die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* eingefügt. Das Fragment und der Vektor pBGS18 wurden mit den Enzymen *XbaI* und *HindIII* geschnitten. Der Vektor wurde dephosphoryliert und mit dem Fragment ligiert. Das resultierende Plasmid wurde in *M. xanthus* transformiert, wo homologe Rekombination ins Zielgen erfolgt.

3.5.4 Konstruktion von „in frame“ Deletionsmutanten von *M. xanthus*

Die Konstruktion von „in-frame“ Deletionsmutanten erfolgte in ersten Teil ähnlich der von Insertionsmutanten (siehe auch Abb. 25). Es wurden zunächst zwei Fragmente, die das zu mutierende Gen flankierten per PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass die beiden PCR-Produkte als Templates in einer zweiten PCR dienen konnten, um so ein Fusionsprodukt aus beiden zu amplifizieren. Dieses wurde in den Vektor pBJ114 kloniert, welcher neben einer Resistenz gegen Kanamycin noch das Gen für ein Protein trägt, welches in Anwesenheit von Galaktose ein toxisches Produkt syntetisiert. Der resultierende Vektor wurde in den entsprechenden Stamm von *M. xanthus* transformiert, wo es zu einer homologen Rekombination in einer der beiden flankierenden Regionen des Zielgens kam. Nach einer Inkubation bei 32°C wurden Transformanten vereinzelt und deren Genotyp durch die Resistenz gegen Kanamycin und durch PCR (Oligonukleotid E MXAN0207 for + fwd bzw. F MXAN0207 rev + rev) bestätigt.

Die so erzeugte Insertionsmutante wurde in CTT-Medium bei 32°C kultiviert, zentrifugiert, gewaschen und in CTT-Medium aufgenommen, um eine OD₅₅₀ von 0,5-0,7 einzustellen. Von dieser Suspension wurden 100 µl und 200 µl in 55°C warmen CTT-Softagar gegeben, gevortext und auf CTT-Agarplatten mit 1% Galaktose plattiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 32°C, Kolonien wurden vereinzelt und deren Genotyp durch eine PCR mit den Oligonukleotiden E MXAN0207 for und F MXAN0207 rev bzw. G MXAN0207 for und H MXAN0207 rev, sowie durch die Resistenz gegenüber Galaktose bzw. Sensitivität gegenüber Kanamycin bestätigt.

3.5.5 Präparation von DNA aus *E. coli* und *M. xanthus*

Für die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA erfolgten mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer der Firma Nanodrop (Wilmington).

Die DNA-Präparation aus Zellen von *M. xanthus* erfolgte nach dem Protokoll von Avery und Kaiser (Avery & Kaiser, 1983). Zur DNA-Gewinnung

wurde eine *M. xanthus*-Kolonie in 8 ml 1% CTT-Medium (Tabelle 4) bei 32°C und 230 rpm bis zu einer $OD_{550} > 1$ kultiviert und dann bei 8.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der entstehende Zell-Überstand wurde verworfen, während das Zentrifugat in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendiert wurde. Nun folgte die Zugabe von 80 µl einer 2,5 mg/ml Proteinase K-Stammlösung (Proteinase K in 10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10 mM NaCl) und 80 µl eines Rapid-Lysis-Mix (5% SDS; 0,125 M EDTA; 0,5 M Tris-Cl, pH 9,4; sterilfiltriert). Die Inkubation des Reaktionsansatz dauerte 1 Stunde bei 37°C. Mit einer Kanüle (Größe 22) und einer 1 ml-Spritze erfolgte durch Hoch- und Runterziehen das Scheren der DNA. Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol folgten mehrere Phenol- und Chloroform-Extraktionsschritte (Sambrook, et al., 1989). Die Fällung der DNA erfolgte mit 2 Volumen 6 % Ethanol für 10 Minuten bei 8.000 x g, anschließend wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000.

Für die Überprüfung des Vorhandenseins von Genen in *M. xanthus*-Mutanten mittels PCR kam zur Präparation von genomischer DNA das Lyse-N-Go™ PCR Reagent der Firma Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben zur Anwendung.

3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion erfolgte mit Platinum® Pfx DNA Polymerase von Invitrogen (Kalsruhe) und Eppendorf® MasterMix der Firma Eppendorf (Hamburg). Der Auftrag für die Synthese von Oligonukleotiden ging vor allem an die Firma Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim).

Die notwendigen Komponenten für die PCR mit Platinum® Pfx DNA Polymerase wurden nach Herstellerangaben zugegeben (Tabelle 11).

Tabelle 12: PCR-Protokoll Platinum® Pfx DNA Polymerase (50 µl Ansatz)

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x Pfx "Amplification Buffer"	5 µl	1x
10 mM dNTP Mix	1,5 µl	0,3 mM
50 mM MgSO ₄	1 µl	1 mM
2 Primer (je 10 µM)	je 2 µl	je 0,4 µM
genomische DNA bzw. Plasmid-DNA	1 µl	10 pg - 200 ng
Platinum Pfx DNA Polymerase	0,8 µl	2 units
10x "Enhancer" – Lösung (bei hohem GC-Anteil der DNA)	5 µl	1x

Zur Überprüfung von Integrationen in Plamid-DNA wurde 2,5x Eppendorf® MasterMix (1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase; 50 mM KCl; 30 mM Tris-Cl, pH 8,3; 1,5 mM Mg²⁺; 0,1% Igepal®-CA630 (Nonylphenol-ethoxylat), 200 µM je dNTP) als PCR-Fertigmix verwendet, dem nur noch Wasser und die Primer zugefügt werden mussten (Tabelle 12). Bei schwachen PCR-Produkten verbesserte die Zugabe von 10% DMSO die Spezifität der Oligonukleotide, was zu einer besseren Ausbeute verhelfen konnte.

Tabelle 13: PCR-Protokoll Eppendorf® MasterMix (20 µl Ansatz)

Komponente	Volumen	Endkonzentration
2,5 x Eppendorf® MasterMix	8 µl	1 x (incl. 1,5 mM Mg ²⁺)
2 Primer (je 10 µM)	je 1 µl	je 0,5 µM
genomische bzw. Plasmid-DNA	1 µl	10 pg - 200 ng
H ₂ O	10 µl	

Die PCR-Programme wurden je nach erwarteter Fragmentgröße in der Anlagerungstemperatur, der Polymerisationsdauer und der Zyklenanzahl variiert, wobei das in Tabelle 13 beschriebene Grundprinzip der PCR zugrunde lag. Die Optimierung der PCR-Programme resultierte aus der Nutzung des Mastercycler egradient der Firma Eppendorf (Hamburg), wobei die optimierten PCR-Reaktionen dann im Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) erfolgten.

Tabelle 14: Standard PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	180 Sekunden
2. Denaturierung *	94°C	30 Sekunden
3. Primer-Anlagerung *	50-61°C (5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer)	30 Sekunden
4. Polymerisation *	72°C	~ 60 Sekunden pro kb
5. Finale Polymerisation	72°C	240 Sekunden
6. Aufbewahrung	4°C	∞

* = 30x wiederholt

Tabelle 15: PCR-Programm (Eppendorf® MasterMix)

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	180 Sekunden
2. Denaturierung *	94°C	30 Sekunden
3. Primer-Anlagerung *	60°C	30 Sekunden
4. Polymerisation *	72°C	~ 60 Sekunden pro kb
5. Finale Polymerisation	72°C	180 Sekunden
6. Aufbewahrung	4°C	∞

* = 35x wiederholt

3.5.7 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Gelkammern mit einem Elektrodenabstand von 12 cm verwendet, die vom MPI Marburg hergestellt wurden. Die Proben wurden dazu in Taschen von 1% Agarosegelen in 1x TBE-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und dann bei einer Spannung von 120 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Ethidiumbromid, hier als interkalierender Farbstoff verwendet, um die DNA anzufärben, lag als 10 mg/ml Stammlösung vor und wurde in einer 1:10.000-Verdünnung dem Agarosegel zugefügt. Als Größen- und Mengenstandard dienten die DNA-Marker Hyperladder I-V von Bioline (Luckenwalde). Die DNA-Proben wurden

zum Beladen der Geltaschen mit 5x Auftragspuffer (Bioline, Luckenwalde) (32,5% Sucrose; 5 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,15% Bromphenol-Blau) versetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA durch das Ethidiumbromid mit einem 2UV-Transilluminator (UVP-Bio-Doc-IT-System, USA) bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit einem Videoprintgerät Mitsubishi Electronic P93E dokumentiert.

Die Isolierung von DNA aus dem Agarosegel und die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit bzw. QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden) oder des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research (HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg).

3.5.8 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Der Restriktionsverdau von Plasmid- oder linearer DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach den Herstellerangaben. Dabei werden die Ansätze für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend zur Kontrolle mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Ligation von DNA musste das Insert im 5-fachen Überschuß mit dem Vektor und T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a.M. bzw. Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben bei 18°C über Nacht inkubiert werden. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser mit Antarctic Phosphatase von New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.) vor der Ligation dephosphoryliert.

3.5.9 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Die gewünschten *E. coli* Stämme (Top 10 und Rosetta 2) wurden von einer Übernachtskultur in 20 ml LB-Medium inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C 300 rpm bis auf eine OD₄₅₀ ~ 0,7 inkubiert, sofort auf Eis gestellt und geerntet (3500 rpm; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml eiskalter 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3500 rpm; 10 min; 4°C) und das Pellet in 1 ml

eiskalter 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert, 10 min auf Eis stehen gelassen und als 250 µl Aliquots bei –80°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.5.10 Transformation von *E.coli*-Zellen

Für die Transformationen von *E. coli* zur Plasmidvermehrung wurden chemisch kompetente Top 10 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Expression von Proteinen wurden die Konstrukte in Rosetta 2 (Novagen/Merck, Darmstadt) Zellen transformiert. Der Ligationsansatz von 20-50 µl wurde mit 200 µl chemisch kompetenter Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden danach wieder für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und für 30-60 min bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3500 rpm; 10 min; Raumtemperatur) und das Pellet in einem kleinen Rest des Überstandes resuspendiert. Ausplattiert wurde auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika Konzentrationen (siehe 1.3 Medien).

3.5.11 Transformation von *M. xanthus*-Zellen

Der gewünschte *M. xanthus* Stamm wurde in 5 ml CTT-Medium ohne Antibiotika bis zu einer OD₅₅₀ von ~ 0,7 angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden pelletiert (13000 rpm; 2 min; RT). Das Zellpellet wurde 3x in 1 ml sterilem H₂O gewaschen und dann in 40 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Plasmid DNA (2 µl mit etwa 0,1- 1 µg DNA) wurde ca. 30 min dialysiert (5 µl in der Mitte einer Millipore Membran VSWP, welche in einer Petrischale mit 30 ml H₂O schwamm). Dann wurde die DNA mit den 40 µl kompetenten *M. xanthus* Zellen in eine 0,1 cm Bio-Rad Elektroporationsküvette überführt und mit einem Puls von 0,65 kV, 400 Ω und 25 µF des Gene-Pulser II (BioRad, München) elektroporiert. Sofort nach der Impulsgabe wurde 1 ml CTTYE-Medium in die Küvette gegeben und der Reaktionsansatz bei 32°C für 4-8 h, oder gegebenenfalls über Nacht, inkubiert. Der Kultur wurde 3-4 ml CTT-Soft-Agar hinzugegeben und damit im Plattengussverfahren eine CTT-Platte (Antibiotika Konzentrationen siehe Tabelle 3) überschichtet. Die Ansätze wurden bei 32°C

für ca. 5 Tage inkubiert und Transformanden auf neuen CTT-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

Für die Verifikation der Integration von Plasmid DNA via „site-specific recombination“ in die chromosomale „Mx8-attachment-site“ von *M. xanthus* wurde eine PCR wie zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Gewinnung von genomischer *M. xanthus* DNA als Matrize für die PCR, wurde eine Einzelkolonie eines transformierten *M. xanthus* Stammes in 25- 50 µl H₂O resuspendiert, 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Von dem Überstand wurde dann 1 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Überprüfung eines Stammes wurden drei Reaktionsansätze mit verschiedenen *attB*- und *attP*-Oligonukleotidpaaren (Magrini et al., 1999) angesetzt. Nach der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit überprüft.

Für die Verifikation der Integration durch homologe Rekombination der Plasmid DNA in das Genom von *M. xanthus* wurde ebenfalls eine Kolonie-PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt.

3.5.12 Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Eine Übernachtskultur des Stammes AH109 wurde auf 50 ml YPD zu einer OD₆₀₀ ~0,2 (entspricht 5×10^6 Zellen/ml) angeimpft. Nach Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ ~0,8 wurden die Zellen 5 min bei 2000 g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 25 ml sterilem H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml 100 mM Lithium-Acetat Lösung aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 15 s bei 16000 g wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 0,5 ml 100 mM Lithium-Acetat Lösung resuspendiert und jeweils zu 50 µl aliquotiert. Die Zellen wurden jedes Mal frisch hergestellt und sofort für die Transformation eingesetzt.

3.5.13 Transformation von *S. cerevisiae* für „Yeast-Two-Hybrid“-Analysen

Zu Aliquots von je 50 µl Zellen wurde nacheinander 10 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml), 250 ng des zu transformierenden Plasmids und 6 µl DMSO

zugegeben und gemischt. Beim Vortexen wurden 300 µl PEG-Lösung zugemischt. Anschließend wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert, dann wurde die Temperatur auf 42°C erhöht und die Zellen weitere 30 min inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz konnte eine weitere Stunde bei 30°C inkubiert werden. Schließlich wurden die Zellen für 1 s bei 16000 g abzentrifugiert, in 1 ml H₂O aufgenommen und auf Synthetic Drop-Out Agar-Medium (-Tryptophan/-Leucin) ausplattiert. Nach 3-6 Tagen waren Kolonien transformierter Zellen sichtbar. Von diesen wurden möglichst weiße Kolonien auf Synthetic Drop-Out Agar-Medium (-Trp/-Leu/-His/-Ade/+X-α-Gal) ausgestrichen und 3-6 Tage bei 30°C inkubiert. Anhand von Wachstum und Färbung konnten Rückschlüsse auf Protein-Protein-Interaktionen gezogen werden.

3.5.14 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger in der Abteilung Ökophysiologie im MPI Marburg durchgeführt. Dazu wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet und die Proben mit dem 3130 Genetic Analyser von Applied Biosystem analysiert. In einem Ansatz wurden 3 µl BigDye Terminator CycleMix, 2 µl 5-facher Dilution Buffer, 3 µl Plasmid- DNA, 1µl Primer (5 pmol/µl) und 11µl HPLC-Wasser gegeben. Nach dem in Tabelle 15 angegebenen Programm wurde die PCR im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von jeweils 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6 bis 4,8), 80 µl HPLC-Wasser und 400 µl 96%-igem Ethanol für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 20°C, wonach das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Das Ethanol wurde vollständig abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und 20 µl Formamid aufgenommen. Das Beladen und Starten der Anlage erfolgte durch technisches Personal, und die Chromatogramme bzw. Sequenzen konnten am nächsten Tag am Computer ausgewertet werden.

Tabelle 16: PCR-Programm zur DNA-Sequenzierung. Die Schritte 2 und 3 wurden 25-mal wiederholt.

Schritt 1: Initiale Denaturierung	96°C	1 Minute
Schritt 2: Denaturierung	96°C	10 Sekunden
Schritt 3: Anlagerung der Oligonukleotide/Polymerisation	60°C	4 Minuten
Schritt 4: Aufbewahrung	4°C	

3.5.15 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

In diesem Experiment wurden Oligonukleotide (siehe Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide) verwendet, die ein Fragment mit einer Länge von etwa 100 Basenpaaren aus dem Zielgen amplifizierten. Die Effizienz jedes Oligonukleotid-Paares wurde zunächst folgendermaßen bestimmt. Als Template wurde jeweils 1 µl genomischer DNA in den Konzentrationen 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl und 10 pg/µl eingesetzt. In den Ansatz wurden außerdem 12,5 µl SybrGreen PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), 0,25 µl Oligonukleotid 1 (10 µM), 0,25 µl Oligonukleotid 2 (10 µM) und 11 µl Wasser gegeben. Es folgte die qPCR im 7300Real Time PCR System von Applied Biosystems (Darmstadt) gemäß dem in Tabelle 16 angegebenen Programm. Die Ct-Werte bei einem definierten Schwellenwert wurden linear gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen, wodurch man eine Gerade mit negativer Steigung erhielt. Aus dieser Steigung wurde nach der Formel $E = 10^{-\frac{1}{m}}$ die Effizienz berechnet (E = Effizienz des Oligonukleotids; m = Steigung der Geraden).

Tabelle 17: Programm der qPCR. Die Schritte 2 und 3 wurden 40-mal wiederholt.

Schritt 1 : Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten
Schritt 2: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 3: Anlagerung der Oligonukleotide/Polymerisation	60°C	1 Minute
Schritt 4: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 5: Aufzeichnung der Dissoziationskurve	60°C	20 Sekunden
Schritt 6: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 7: Aufbewahrung	4°C	

Nun erfolgte die eigentliche real-time Polymerase-Kettenreaktion. Der Ansatz entsprach dem oben genannten. Als Template wurde 1 µl cDNA eingesetzt, welche ein Arbeitskollege aus Zellen präpariert hatte, die nach verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung in Flüssigkultur geerntet wurden. Als Negativkontrollen dienten 1 µl RNA bzw. 1 µl Wasser. Es wurde eine qPCR gemäß Tabelle 16 durchgeführt. Die Dissoziationskurve wurde als Kontrolle aufgezeichnet, um die Schmelztemperatur des entstandenen Produkts zu überprüfen.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Differenzen der mittleren Ct-Werte von cDNA aus entwickelten Zellen und cDNA aus vegetativen Zellen, welche als Referenz dienten. Aus den so erhaltenen ΔC_t -Werten konnte die relative Transkriptmenge gemäß der Formel $T_{rel} = E^{\Delta C_t}$ errechnet werden (T_{rel} = relative Transkriptmenge; E = Effizienz des Oligonukleotid-Paares). Die relative Transkriptmenge hatte für vegetative Zellen stets den Wert 1 und für Zellen aus Zeitpunkten der Entwicklung entsprechend vielfache Werte.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Um Proteine heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurde der Stamm Rosetta 2(DE3) verwendet. Es handelt sich dabei um ein T7-Polymerase-abhängiges System, welches mit IPTG induzierbar ist und ein Plasmid trägt, das die Gene für einige seltene tRNAs exprimiert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, was mittels PCR bestätigt wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf LB-Medium, welchem Chloramphenicol sowie das dem transformierten Plasmid entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde, bei 37°C in einer Vorkultur. Diese wurde zum Beimpfen einer Hauptkultur in LB-Medium verwendet, deren OD bei 550 nm photometrisch verfolgt wurde. Beim Erreichen einer OD_{550} von 0,8 wurde eine Probe der uninduzierten Kultur genommen, zentrifugiert und das Zell-Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Danach wurde die Hauptkultur mit 0,1 M bis

1,0 M IPTG versetzt und bei 18°C für ca. 18 Stunden weiter inkubiert. Nach dieser Zeit wurde eine weitere Probe genommen, zentrifugiert und das Zell-Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Kultur wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 8000 rpm geerntet und durch Ultraschall aufgeschlossen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 4700 rpm, um Einschlusskörper von der löslichen Fraktion zu trennen. Die verschiedenen Proben wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.6.2 Aufreinigung von Proteinen mit His₆-Tag

Man kann die Proteine sowohl unter nativen Bedingungen als auch unter denaturierten Bedingungen aufreinigen. Dies ist abhängig von der Löslichkeit des Proteins. Die Fraktion, in der sich das Protein befindet, wird für die weitere Aufreinigung verwendet. 5 ml einer Fraktion lassen sich mit 0,5-1,0 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) aufreinigen. Zum Äquilibrieren wurde die Ni-NTA-Agarose mit Lyse-Puffer gewaschen. Danach wurde die Protein-Fraktion mit der Ni-NTA-Agarose für 1 Stunde bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf eine Poly Prep Chromatographie Säule (Bio-Rad, München) gegeben. Es wurde etwas gewartet bis sich die Agarose abgesetzt hatte. Die Säule wurde geöffnet und der Durchfluss aufgefangen. Dann wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und der Durchfluss wiederum aufgefangen. Die Elution fand in 500 µl-Schritten statt, dabei wurde ein Gradient aus Imidazol verwendet. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt. Später wurde auf einen SDS-Polyacrylamidgel geschaut, in welcher Fraktion sich das Protein befand.

Tabelle 18: Puffer für die Aufreinigung von Proteinen unter nativen Bedingungen.

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	10 mM Imidazol
	pH 8,0
Wasch-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄

Elutionspuffer	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	10 mM – 500 mM Imidazol
	pH 8,0

Tabelle 19: Puffer für die Aufreinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen.

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄
	10 mM Tris-HCl
	8 M Urea
	pH 8,0
Wasch-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄
	10 mM Tris-HCl
	8 M Urea
	pH 6,8
Elutionspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄
	10 mM Tris-HCl
	8 M Urea
	10 mM – 500 mM Imidazol
	pH 5,9

3.6.3 Reinigung von Einschlusskörpern und Rückfaltung von Proteinen

Die Kultur wurde angezogen, wie bereits unter 3.6.1 beschrieben und die Zellen wurden geerntet. 5 g (Feuchtgewicht) Zellen wurden in 25 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA bei 4°C mit einem Ultraturrax (10000 rpm) homogenisiert. Danach wurde 1,5 mg Lysozym pro Gram Zellen zugegeben, kurz mit dem Ultraturrax gemischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer French Press aufgeschlossen. Um die DNA zu verdauen wurde MgCl_2 in einer Endkonzentration von 3 mM und DNase in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben und für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Später wurde 0,5-fache Volumen an 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1,5 M NaCl pH 7,0 zur Lösung hinzu gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Einschlusskörper durch eine Zentrifugation bei 20000 rpm für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 40 ml 0,1 M Tris-HCl pH7, 20 mM EDTA mit einem Ultraturrax resuspendiert. Danach wurde die Zentrifugation noch einmal wiederholt und 50 mg Pellet in 5 ml 6 M GdmCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8 und in der Gegenwart von 100 mM DTT, sowie 1mM EDTA gelöst und für 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Der pH wurde durch tropfenweise Zugabe von 1 M HCl auf pH 3-4 gesenkt, und durch Zentrifugation bei 10000 g wurden die unlöslichen Zell-Trümmer entfernt. Um das DTT komplett zu entfernen wurde zweimal für 2 Stunden bei 25°C gegen 500 ml 4 M GdmCl, 10 mM HCl dialysiert. Danach wurde über Nacht bei 4°C gegen 1 Liter 4 M GdmCl dialysiert. Am nächsten Tag wurde mit einem Bradford-Assay die Protein-Konzentration bestimmt.

Um das Protein zurück zu falten wurden 80 ml von dem folgenden Rückfaltungspuffer angesetzt: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM DTT, 0,5 M L-Arginin-HCl. Zu diesem wurde tropfenweise (40 µl in 30 Minuten) 4 mg Proteinlösung vom Vortag zugegeben. Dann wurde die Lösung auf einem Magnetrührer bei 4°C über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurden die 80 ml Lösung mit Protein mit Hilfe von Ultrafiltration mit Amicon® Ultracel-10k Filtern bzw. Microcon® Ultracel YM-10 Filtern der Firma Amicon ankonzentriert. Danach wurde das Protein noch in A50MC Puffer (10 mM MOPS; 5 mM CaCl_2 ; 5 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; pH 7,2) umgepuffert und konnte direkt in den *in vitro* Protease-Assay eingesetzt werden.

3.6.4 Biochemische Zellfraktionierung

Die biochemische Zellfraktionierung wurde durchgeführt wie in (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) beschrieben. *M. xanthus* Zellen wurden in flüssigem CTT-Medium bis zu einer Dichte von 5×10^8 Zellen pro ml inkubiert und danach 10 ml geerntet oder 5×10^9 Zellen wurden für 12 Stunden auf TPM-Platten entwickelt und geerntet. Die Zellen wurden in 1 ml Tris-HCl (pH 7,6) resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zell-Trümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 5000 g für 10 Minuten bei 4°C entfernt. Der zell-freie Überstand wurde danach bei 45000 g für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand war angereichert mit löslichen Proteinen. Das Pellet mit den Membran-Fractionen wurde in 0,8 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2% Triton X-100 resuspendiert und noch einmal, wie bereits zuvor beschrieben, ultrazentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt Proteine der inneren Membran, während Protein der äußeren Membran sich im Pellet befanden. Das Pellet wurde wieder in 0,2 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2% Triton X-100 resuspendiert. Die Proteine der Proben wurden alle mit Aceton gefällt und gleichen Volumina SDS-Probenpuffer resuspendiert. Später wurden gleiche Volumina der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.6.5 Untersuchung sekretierter Proteine

Um sekretierte Proteine von vegetativen Zellen zu isolieren ließ man die Zellen in CTT-Medium auf eine Dichte von 5×10^8 Zellen pro ml wachsen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und der zell-freie Überstand wurde auf 4°C gelagert.

Um sekretierte Proteine von entwickelten Zellen zu isolieren, wurden die Zellen in Suspension dem Hungerzustand ausgesetzt (Kuspa et al., 1986). Die Zellen wurden angezogen wie bereits zuvor beschrieben, geerntet, mit eiskaltem MC7 Puffer gewaschen und in MC7 Puffer mit Raumtemperatur zu einer kalkulierten Dicht von 1×10^9 Zellen pro ml resuspendiert. Die Suspension der Zellen wurde bei 32°C auf dem Schüttler bei 280 rpm für 3 Stunden inkubiert. Der zell-freie Überstand wurde durch Zentrifugation isoliert. Zusätzlich wurde in einen separaten Versuchsansatz über eine Zeitspanne von 24 Stunden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen.

Sowohl der Überstand der vegetativen als auch der Überstand der entwickelten Zellen wurden mit 0,22 µm Sterilfiltern der Firma Roth filtriert und anschließend durch Ultrafiltration mit Microcon® Ultracel YM-10 Filtern der Firma Amicon ankonzentriert. Protein von 10^9 Zellen pro Probe wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und mit Western Blot Analyse analysiert.

3.6.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgte mit Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad, München). Das Prinzip beruht auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Zu jedem Testansatz wurde, wie in der folgenden Tabelle 19 beschrieben, zuerst die entsprechende Menge Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz, und dann die Probe bzw. der Proteinstandard (Rinderserumalbumin) gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm mit einem Ultrospec 2100 pro Spektrometer der Firma Amersham Bioscience (München), woraus durch Vergleich mit der Eichgeraden die Proteinkonzentrationen errechnet werden konnten.

Tabelle 20: Proteinbestimmung.

1. Wasser	800 µl	...	700 µl	780 µl
2. Bradford-Reagenz	200 µl	...	200 µl	200 µl
3. Probe bzw. Standard (100 µg/ml BSA)	0 µl BSA	...	100 µl BSA	20 µl Probe

3.6.7 *In vitro* Protease-Assay

Der *in vitro* Protease-Assay wurde durchgeführt wie in (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) beschrieben. *M. xanthus* Zellextrakt wurde für 9 Stunden auf TPM-Platten inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig von der Platte gekratzt, abzentrifugiert und auf eine Dichte von 5×10^{10} Zellen pro ml in A50 Puffer (10 mM MOPS; 1 mM CaCl_2 ; 4 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; pH 7,2) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. 3,75 µg Protein des Zellextraktes wurden in die Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Mal-p25 in A50 Puffer wurde in einer Endkonzentration

von 2,5 μM zur Reaktion hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurde sie durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer abgestoppt, für 3 Minuten auf 96°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Später wurden gleiche Volumina der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Wurden gereinigte und renaturierte Proteine im *in vitro* Protease-Assay benutzt, wurde 6,0 μg des gereinigtem und renaturiertem Protein in eine Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 25 μl eingesetzt. Die Endkonzentration von 2,5 μM Mal-p25 wurde beibehalten. Für gereinigte Proteine wurde im *in vitro* Protease-Assay A50MC Puffer (10 mM MOPS; 5 mM CaCl_2 ; 5 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; pH 7,2) benutzt mit erhöhten Konzentration an CaCl_2 und MgCl_2 . Zudem wurden die Reaktionen für 24 Stunden bei 32°C inkubiert. Danach wurde sie ebenfalls durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer abgestoppt, für 3 Minuten auf 96°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Später wurden gleiche Volumina der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.6.8 Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von Polypeptiden wurden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970; Schagger & von Jagow, 1987). Dazu wurden 10%-ige, 14%-ige oder 16%-ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, welche in der MiniProtean II Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad (München) gegossen wurden. Die Zusammensetzung der Gele ist in den Tabellen 20 und 21 aufgezeigt. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben bei Bedarf gefällt und in SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl; 2% SDS; 10% Glycerin; eine Spatelspitze Bromphenolblau; pH 6,8; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin; 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin; 0,6 mM Phenylmethylsulfonylfleurid) aufgenommen. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 2,6 M 1,4-Dithiothreitol wurden diese für 5 Minuten bei 96°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben zusammen mit dem Molekularmassenstandard – PageRuler Protein Ladder bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) – aufgetragen und es erfolgte die Elektrophorese in der oben beschriebenen und mit entsprechendem Puffer (für Laemmli-Gele: 25 mM Tris; 190 mM Glycin;

0,1% SDS bzw. für Schägger-Gele: 100 mM Tris-HCl; 100 mM Tricin; 0,1% SDS; pH 8,25 auf der Kathodenseite und 200 mM Tris-HCl; pH 8,9 auf der Anodenseite) gefüllten Apparatur bei einer Spannung zwischen 80 und 150 V. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Lauffront aus Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hat. Um die Polypeptidbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Lauf für 2 Stunden oder über Nacht in Färbelösung (25% „-Propanol; 10% Essigsäure; 0,5% CuSO₄; 0,05% Coomassie R250; 0,05% Crocein Scarlet) auf dem Schüttler inkubiert. Das Entfärben von nicht an Protein gebundenem Farbstoff erfolgte entweder in Wasser oder in Entfärbelösung (12% 2-Propanol; 7% Essigsäure; 0,5% CuSO₄). Danach konnten die Gele eingescannt werden.

Tabelle 21: Zusammensetzung von SDS-Gelelen nach Laemmli.

Lösung	Trenngel		Sammelgel	
	eingesetztes Volumen	Endkonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	375 mM	-	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	2,5 ml	125 mM
40% Acrylamid/ Bisacrylamid	3,5 ml	14%	1,0 ml	4%
Wasser	4,0 ml	-	6,5 ml	-
100% TEMED	10 l	0,10%	50 l	0,5%
10% APS	60 l	0,06%	120 l	0,12%

Tabelle 22: Zusammensetzung von SDS-Gelelen nach Schägger.

Lösung	Trenngel		Sammelgel	
	eingesetztes Volumen	Endkonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
3,0 M Tris-HCl (pH 8,45)	3,3 ml	1000 mM	2,48 ml	745 mM
10% SDS	0,10 ml	0,1%	0,10 ml	0,1%
55% (w/v)	2,42 ml	13,3%	-	-

Glycerin				
Wasser	0,04 ml	-	6,31 ml	-
40% Acrylamid/ Bisacrylamid	4,00 ml	16%	1,0 ml	4%
100% TEMED	8 µl	0,08%	10 µl	0,10%
10% APS	100 µl	0,10%	100 µl	0,10%

3.6.9 Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse

Die durch Western-Blot zu untersuchenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer so verdünnt, dass Proteinmengen zwischen 5,0 µg und 15 µg auf das entsprechende SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden konnte. Als Molekularmassenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot). Es wurde eine Elektrophorese wie in 1.6.6 beschrieben durchgeführt und die Proteine vom ungefärbten Gel durch Elektroblothing in einer Hoefer TE 77 semi-dry tranfer unit der Firma Amersham Bioscience (München) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Als Transferpuffer wurde ein diskontinuierliches Tris/Glycin-Puffersystem nach Tabelle 22 verwendet. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran für 1,5 bis 2 Stunden.

Tabelle 23: Transferpuffer für Western-Blots.

Membranseite (Anode)		Gelseite (Kathode)	
Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration	Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
3,03 g Tris	25 mM	6,06 g Tris	50 mM
14,4 g Glycin	192 mM	28,8 g Glycin	384 mM
0,1 g SDS	0,01%	2,0 g SDS	0,2%
250 ml Methanol	25%	100 ml Methanol	10%

Im Anschluß daran wurde die Membran zum Absättigen bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten oder bei 4°C über Nacht mit 5% Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; 0,05% TWEEN 20; pH 7,6) unter schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Bindung des spezifischen

Primärantikörpers, welcher üblicherweise aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde. Dieser wurde im Verhältnis 1:100 bis 1:10000 in 2% Milchpulver in TBS-T gelöst, und die Membran darin bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 Minuten und einmaligem Waschen für 15 Minuten erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers – anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege als Konjugat mit Peroxidase aus Meerrettich von der Firma Pierce (Bonn). Dieser wurde im Verhältnis 1:15000 ebenfalls in 2% Milchpulver in TBS-T gelöst. Die Inkubation dauerte 1 Stunde, und die Membran wurde danach einmal 15 Minuten und viermal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Um die Proteinbanden zu detektieren, wurde die Membran zunächst mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Pierce (Bonn) benetzt und etwa 1 Minute inkubiert. Beim Umsetzen des Substrates durch die Peroxidase wird Licht emittiert, weshalb in einer Kassette ein CL-Xposure Film von Pierce (Bonn) auf die Membran gelegt und je nach Signalstärke zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten belichtet wurde. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer FPM-100A Entwicklungsmaschine von Fujifilm Europe (Düsseldorf).

3.6.10 Antiseren und Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen mit in *E.coli* heterolog produzierten und aufgereinigten His6-PopC und His6-MXAN0207 immunisiert. Die Immunisierung wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) übernommen.

Da die Verwendung von Antiseren gegen PopC und MXAN0207 im Western-Blot viele unspezifische Banden hervorrief, wurden die gewünschten spezifischen Antikörper aus dem Serum gereinigt.

Hierfür wurde zunächst ein präparativer Western-Blot durchgeführt. Insgesamt wurde etwa 70 µg Protein auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Elektrophoretikum folgte das Anfärben der Membranränder (PVDF-Membran) mit Amidoschwarz 10 B (0,1% in 45% Methanol, 10% Essigsäure; Entfärbelösung: 90% Methanol, 2% Essigsäure). Die gewünschte

Proteinbande wurde, nachdem sie durch Anlegen der gefärbten Membranränder identifiziert wurde, ausgeschnitten, in etwa fünf mm lange Streifen zerteilt und mit 5% Milchpulver in PBS-T (8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 70mM NaCl, 0,05% TWEEN 20) abgesättigt. Nach mehrmaligem Waschen in 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 130 mM NaCl und 0,5% Triton X-100 wurden die Streifen in das Antiserum gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mäßig geschüttelt. Anschließend wurden die Streifen aus dem Antiserum herausgefischt und erneut dreimal gewaschen. Die abgetropften Streifen wurden dann für 30 Sekunden in 1 ml Elutionspuffer, welcher 0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, 0,5% Triton X-100 und 0,1% Rinderserumalbumin bei pH 3,0 enthielt (Harlow & Lane, 1988), vortexiert. Zum Neutralisieren der Flüssigkeit, die eluierte spezifische Antikörper enthielt, wurde 350 μl 1 M Tris/HCl pH 7,5 zum Überstand zugesetzt. Die Streifen konnten für mehrmalige Reinigungen verwendet werden.

3.6.11 Identifizierung von Proteinen/Peptiden durch Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen wurden massenspektrometrische Analysen mittels „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight“ (MALDI-TOF)-MS durchgeführt. Dabei wurden Proteinlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen mit einer gesättigten Sinapinsäurelösung (in 0,1% Trifluoressigsäure; 67% Acetonitril) im Verhältnis 1:1 gemischt, auf einen Probenträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die anschließende Messung erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 25000 V, einer Gitterspannung von 23000 V, einer Verzögerung von 300 nsec und einer Laserstärke von 50% in einem PerSeptive Biosystems Voyager-DE RP Spectrometer von Applied Biosystems (Darmstadt). Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die entsprechende Software.

Um Proteine weiter zu identifizieren, wurden die entsprechenden Proben durch Zugabe verschiedener spezifischer Proteasen (z.B. Trypsin) proteolytisch verdaut und die molekularen Massen der so erhaltenen Peptide wie oben beschrieben gemessen. Anhand spezifischer Massen („Peptidmassen-Fingerprint“) konnten ein Vergleich mit einem theoretischen, virtuellen Verdau

und ein anschließender Abgleich mit der entsprechenden Datenbank durchgeführt werden.

3.7 Bioinformatische Methoden

3.7.1 Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche

Die Suche nach Protein- oder DNA-Sequenzen aus sequenzierten Organismen erfolgte online über Datenbanken von TIGR (<http://www.tigr.org/cmr>) bzw. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Proteasen im Genom von *Myxococcus xanthus* wurden mit Hilfe der TIGR-Datenbank identifiziert. Basierend auf der Annotation der TIGR-Datenbank wurden die Proteasen in sekretierte und nicht sekretierte Proteasen eingeteilt.

Recherchen nach Proteinsequenzen mit Verwandtschaft zu einer bekannten Sequenz wurden online durch BLASTp auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> durchgeführt. Alternativ wurde auch die Datenbank des EBI auf <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> verwendet.

Die Analyse und der Vergleich verschiedener Protein- und DNA-Sequenzen, sowie die Erstellung von Alignments erfolgte mit dem Programm Vector NTI Suite 9 der Firma InforMax (Oxford, Großbritannien). Dieses diente darüber hinaus zur graphischen Darstellung der Sequenz-Alignments, zur Archivierung von Sequenzen in der persönlichen Vector NTI Datenbank und zur Planung von Klonierungen. Nach erfolgter DNA-Sequenzierung wurden die erhaltenen Chromatogramme ebenfalls mit Vector NTI Suite 9 ausgewertet und die Sequenzen bestimmt. Weiterhin wurden damit verschiedene Berechnungen und Vorhersagen (Zum Beispiel für Erkennungsstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen, Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden usw.) durchgeführt.

3.7.2 Strukturvorhersage von Domänen

Von den 68 sekretierten Proteasen sind 32 sekretierte Serin Proteasen, die mit den folgenden Programmen detailliert untersucht wurden. Die Vorhersage von Domänen aufgrund der Proteinsequenz erfolgte mit dem

SMART-Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Speziellere Server zur Vorhersage bestimmter Domänen waren der TMHMM-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) bzw. der TMPred-Server (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) zur Vorhersage von Transmembran-Helices, der PRED-TMBB-Server (<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/index.jsp>) zur Vorhersage von Beta-Barrel-Strukturen in Proteinen der äußeren Membran und der SignalP-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) zur Vorhersage von Signalpeptiden.

4 Ergebnisse

4.1 Genomanalyse von *M. xanthus*

Um Kandidaten für die sekretierte Serin-Protease PopC zu finden wurde mit Hilfe von bioinformatischen Methoden das Genom von *M. xanthus* analysiert. Dabei konnten 146 Gene identifiziert werden, die für Proteasen kodieren. In Abbildung 7 ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt. Auf der vorhergesagten subzellularen Lokalisation basierend konnte die Zahl der Kandidaten auf 68 sekretierte Proteasen eingeschränkt werden. Dieser Annahme liegt zugrunde, dass diese sekretierten Proteasen Signalpeptide, Transmembran-Regionen oder Domänen, die normalerweise bei sekretierten Proteasen zu finden sind, besitzen. Von diesen 68 sekretierten Proteasen sind 32 Serin-Proteasen. Diese 32 sekretierten Serin-Proteasen lassen sich in vier unterschiedliche Familien einteilen (siehe Tabelle 24). 10 Proteasen gehören zu den Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen, 10 zu den Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen, 4 zu den Rhomboid-ähnlichen Serin-Proteasen und 8 zu den HtrA/DegP-ähnlichen Serin-Proteasen. Die Familien der HtrA/DegP-ähnlichen Serin-Proteasen, der Rhomboid-ähnlichen Serin-Proteasen und der Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen werden in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt, während die Familie der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde.

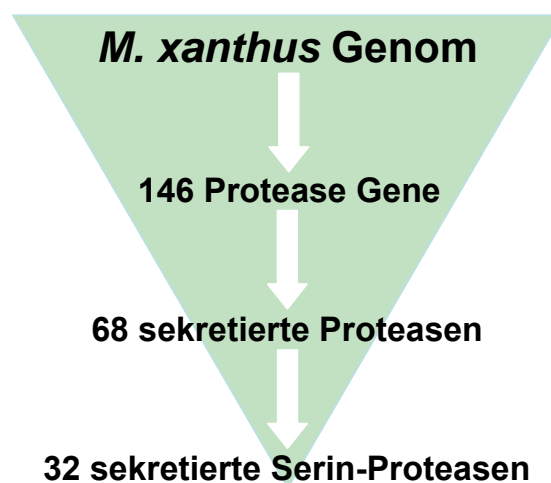


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Genomanalyse von *M. xanthus*. Das *M. xanthus* Genom kodiert für 146 Proteasen. Von diesen kodieren 68 Gene für sekretierte Proteasen. 32 Gene kodieren für sekretierte Serin-Proteasen, die wiederum in vier unterschiedliche Familien eingeteilt werden können.

Gen	Protease-Typ	Beschreibung der Domänenstruktur
<i>MXAN0587</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne, Prä-Peptidase-Domäne (C-terminal)
<i>MXAN1650</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne, Prä-Peptidase-Domäne (C-terminal)
<i>MXAN4006</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne
<i>MXAN4277</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne
<i>MXAN5011</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne
<i>MXAN5394</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne
<i>MXAN5435</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne
<i>MXAN5466</i>	Trypsin	Alpha-lytische Prodomäne, Trypsin-Domäne, Ricin-Domäne
<i>MXAN5887</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne
<i>MXAN6216</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne
<i>MXAN0206</i>	Subtilase	PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN0653</i>	Subtilase	Proprotein Convertase P-Domäne, PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN0998</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN1501</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN1967</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN3285</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne, 5 Transmembran-Segmente
<i>MXAN5417</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN5970</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne
<i>MXAN7209</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne mit PA Domäne
<i>MXAN7328</i>	Subtilase	Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne mit PA Domäne
<i>MXAN0661</i>	Rhomboid	6 Transmembran-Segmente, Rhomboid-Domäne
<i>MXAN1119</i>	Rhomboid	5 Transmembran-Segmente, Rhomboid-Domäne
<i>MXAN4630</i>	Rhomboid	4 Transmembran-Segmente, Rhomboid-Domäne
<i>MXAN5590</i>	Rhomboid	6 Transmembran-Segmente, Rhomboid-Domäne
<i>MXAN0295</i>	HtrA/DegP	Trypsin-ähnliche Domäne, PDZ-Domäne
<i>MXAN0296</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Trypsin-ähnliche Domäne, PDZ-Domäne
<i>MXAN0934</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Trypsin-ähnliche Domäne, 2 PDZ-Domänen
<i>MXAN2084</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Transmembran-Segment, Trypsin-ähnliche Domäne, PDZ-Domäne
<i>MXAN2995</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Trypsin-ähnliche Domäne, 2 PDZ-Domänen
<i>MXAN4330</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Trypsin-ähnliche Domäne, 2 PDZ-Domänen
<i>MXAN4433</i>	HtrA/DegP	Signalpeptid, Trypsin-ähnliche Domäne, 2 PDZ-Domänen
<i>MXAN6647</i>	HtrA/DegP	Trypsin-ähnliche Domäne, 2 PDZ-Domänen

Tabelle 24: Zusammenfassung der 32 sekretierten Serin-Proteasen. Die entsprechenden Gene sind nach Familien geordnet aufgelistet (Trypsin-ähnliche Serin-Proteasen **grün**; Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen **rot**; Rhomboid-ähnliche Serin-Proteasen **blau**; HtrA/DegP-ähnliche Serin-Proteasen **braun**). Zusätzlich ist die Domänenstruktur beschrieben.

HtrA/DegP-ähnliche Proteasen gehören zur Chymotrypsin Familie. Die Mitglieder dieser Familie übernehmen vielerlei Funktionen. Sie sind sowohl an der intestinalen Verdauung, als auch an der IgA-vermittelten Immunantwort beteiligt (Pejler et al., 2007). Ihre katalytische Triade besteht aus einem His-, einem Asp- und einem Ser-Rest. Die Mehrheit dieser Peptidasen ist in sekretorischen Reaktionswegen involviert und besitzt ein N-terminales

Signalpeptid. Sie werden als Vorläuferproteine mit N-terminalen Verlängerungen synthetisiert, welche abgespalten werden, um das jeweilige aktive Enzym zu erhalten. Die Mitglieder dieser Familie können durch Ovomucid und Aprotinin inhibiert werden, allerdings nicht durch PMSF (Clausen et al., 2002).

Bei Rhomboid-ähnlichen Proteasen handelt es sich um integrale Membranproteine, die eine Verwandtschaft zu den Rhomboid-Proteinen aus *Drosophila melanogaster* zeigen. Mitglieder dieser Familie sind in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten zu finden. Ihre aktiven Zentren bestehen aus einem Ser-Rest und einem His-Rest (Wang et al., 2006). Analysen aus *D. melanogaster* lassen vermuten, dass Rhomboid-1 eine intramembran-lokalisierte Serin-Protease ist, die den in der Membran verankerten TGF- α ähnlichen Wachstumsfaktor Spitz direkt spaltet. Dadurch kann dieser den EGF-Rezeptor von *D. melanogaster* aktivieren (Urban et al., 2002). Dieses Rhomboid-1 Protein besitzt drei hoch konservierte His-Reste in der Transmembran-Region. Man vermutet, dass diese an der Protease-Funktion beteiligt sein könnten. Dieser Vorgang kann durch Tosyl-L-phenylalaninchloromethylketon (TPCK) und 3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCI) inhibiert werden (Urban et al., 2001; Urban & Wolfe, 2005). Durch PMSF lassen sich Rhomboid-ähnliche Proteasen jedoch nicht inhibieren (Urban & Wolfe, 2005).

Die Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen gehören der Trypsin Familie an und sind sowohl in Tieren, in Pilzen als auch in Bakterien zu finden und beschrieben (Barata et al., 2002; Sawada et al., 1990; Zeth, 2004). Ihre katalytischen Triaden bestehen aus einem His-, einem Asp- und einem Ser-Rest. Ihre Sekretion ist möglich, da sie mit einem Signalpeptid synthetisiert werden, welches sie zu ihrem sekretorischen Signaltransduktionsweg leitet. Von den tierischen Enzymen weiß man, dass sie entweder direkt sekretiert werden oder für die regulierte Sekretion in Vesikel eingeschlossen werden (Hook & Hwang, 2002).

(Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) führten mit Hilfe eines aus *E. coli* aufgereinigten Fusionsproteins (MalE-p25) und Zellextrakt aus *M. xanthus* (Wildtyp) einen Versuch durch, den wir von nun an *in vitro* Protease-Assay

nennen werden. In diesem *in vitro* Protease-Assay konnte durch Zugabe unterschiedlicher Protease-Inhibitoren gezeigt werden, dass die Aktivität der Serin-Protease PopC durch die Protease-Inhibitoren Aprotinin, Benzamidin und PMSF gehemmt wird. Von HtrA/DegP-ähnlichen Proteasen und Rhomboid-ähnlichen Proteasen wissen wir, dass sie durch PMSF nicht inhibiert werden können (Clausen, et al., 2002; Urban & Wolfe, 2005). Somit kommen diese 12 Serin-Proteasen nicht länger als PopC-Kandidaten in Frage. Aus diesem Grund wurde sich auf die verbleibenden 10 Trypsin und 10 Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen konzentriert. Einige dieser 20 Serin-Proteasen besitzen kein Signalpeptid. Sie werden jedoch trotzdem als PopC-Kandidaten gehandelt, da sie Domänen besitzen, die normalerweise bei sekretierten Proteasen zu finden sind.

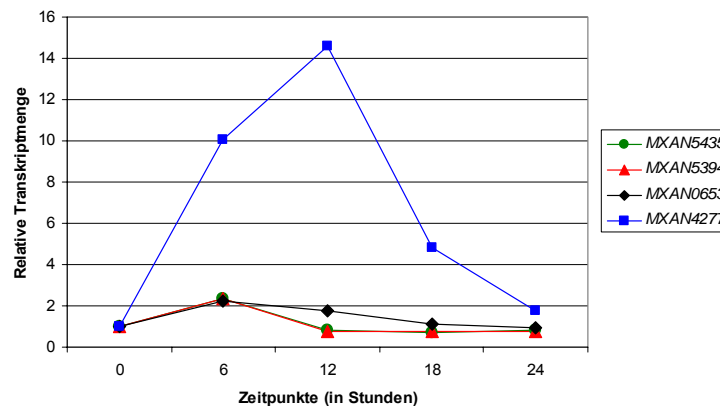


Abbildung 8: Transkriptionelle Regulation von vier Genen während der Entwicklung des Wildtyps DK1622. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung wurde Gesamt-RNA aus Wildtyp-Zellen präpariert, cDNA synthetisiert und diese durch quantitative real-time PCR untersucht. Die grünen Punkte kennzeichnen die Transkriptmengen des Gens *MXAN5435*, die roten Dreiecke die Transkriptmengen des Gens *MXAN5394*, die schwarzen Rauten die Transkriptmengen des Gens *MXAN0653* und die blauen Quadrate die Transkriptmengen des Gens *MXAN4277*.

Um mehr Informationen über diese 20 Serin-Proteasen zu bekommen, wurden die in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Daten der DNA-Microarrays verwendet (Hamann et al., 2007). Da die Aktivität der Serin-Protease PopC während der Entwicklung hoch reguliert wird (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003), wurde nach Genen geschaut, die während der Entwicklung reguliert sind. Von den 20 Genen werden gemäß der Daten der DNA-Microarrays insgesamt 7 Gene während der Entwicklung reguliert. *MXAN0206*, *MXAN1501*, *MXAN7209* und *MXAN7328* werden hoch reguliert, während die Regulation *MXAN1650*, *MXAN1967* und *MXAN5970* während der Entwicklung nach unten

geht. Die Regulation der folgenden vier Gene konnte mit den Daten der DNA-Microarrays nicht abgedeckt werden: *MXAN4277*, *MXAN5394*, *MXAN5435* und *MXAN0653*. Um keine potentiellen Kandidaten für die Serin-Protease PopC zu übersehen, wurde die transkriptionelle Regulation dieser vier Gene während der Entwicklung durch quantitative real-time PCR überprüft.

Gen	Protease-Typ	Beschreibung	Transkriptionelle Regulation während Entwicklung
<i>MXAN0587</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne, Prä-Peptidase-Domäne (C-terminal)	keine
<i>MXAN1650</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne, Prä-Peptidase-Domäne (C-terminal)	runter
<i>MXAN4006</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN4277</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne	hoch
<i>MXAN5011</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN5394</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN5435</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN5466</i>	Trypsin	Alpha-lytische Prodomäne, Trypsin-Domäne, Ricin-Domäne	keine
<i>MXAN5887</i>	Trypsin	Signalpeptid, Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN6216</i>	Trypsin	Trypsin-Domäne	keine
<i>MXAN0206</i>	Subtilase	PeptidaseS8-Domäne	hoch
<i>MXAN0653</i>	Subtilase	Proprotein Convertase P-Domäne, PeptidaseS8-Domäne	keine
<i>MXAN0998</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne	keine
<i>MXAN1501</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne	hoch
<i>MXAN1967</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne	runter
<i>MXAN3285</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne, 5 Transmembran-Segmente	keine
<i>MXAN5417</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne	keine
<i>MXAN5970</i>	Subtilase	Signalpeptid, PeptidaseS8-Domäne	runter
<i>MXAN7209</i>	Subtilase	Signalpeptid, Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne mit PA Domäne	hoch
<i>MXAN7328</i>	Subtilase	Subtilisin Region (N-terminal), PeptidaseS8-Domäne mit PA Domäne	hoch

Tabelle 25: Zusammenfassung der Trypsin- und Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen. Die entsprechenden Gene sind nach Familien geordnet aufgelistet. Zusätzlich ist die Proteinstruktur beschrieben und die Regulation während des Hungerzustands angegeben. Insgesamt sind 8 Gene während der Entwicklung reguliert. Davon sind 3 Gene runter (grün) und 5 Gene hoch (rot) reguliert.

Es wurde Gesamt-RNA aus Wildtyp-Zellen verwendet, die zu bestimmten Zeitpunkten während des Entwicklungsprozesses geerntet worden sind. Dann erfolgte eine quantitative real-time PCR, mit der die Transkriptmengen bestimmt wurden und deren Ergebnisse in Abbildung 8 veranschaulicht sind. Die Messwerte wurden auf die Transkriptmenge von vegetativen Zellen bezogen, welche den Wert 1 erhielt. Es konnte gezeigt

werden, dass die Gene *MXAN5394*, *MXAN5435* und *MXAN0653* während des Hungerzustands nicht signifikant reguliert werden. *MXAN4277* ist hingegen bereits nach 6 Stunden deutlich hoch reguliert. Die Regulation erreicht nach 12 Stunden ein Maximum und fällt danach wieder bis fast auf den Ausgangswert ab. Somit ist das Produkt dieses Gens ebenfalls ein potentieller Kandidat für die Serin-Protease PopC.

In der Tabelle 25 sind noch einmal die 20 Gene der Trypsin- und Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der Daten der DNA-Microarrays und der Resultate der quantitativen real-time PCR sind diese Gene während des Hungerzustands wie folgt reguliert: Die Gene *MXAN4277*, *MXAN0206*, *MXAN1501*, *MXAN7209* und *MXAN7328* werden hoch reguliert. Die Regulation der Gene *MXAN1650*, *MXAN1967* und *MXAN5970* geht hingegen nach unten. Die restlichen Gene sind nicht reguliert. Insgesamt werden also acht Gene signifikant während der Entwicklung reguliert. Die fünf hoch regulierten Gene während der Entwicklung stellen die besten potentiellen Kandidaten für *popC* dar. Dennoch werden auch die drei nach unten regulierten Gene näher untersucht.

4.1.1 Entwicklungsphänotypen der Insertionsmutanten

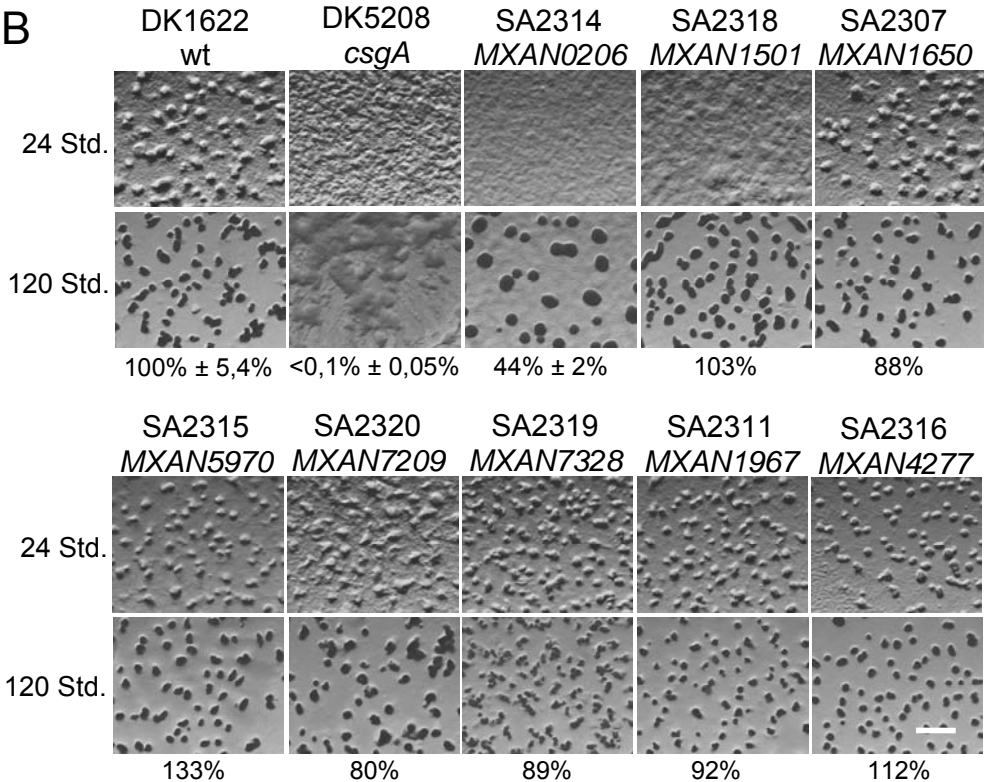
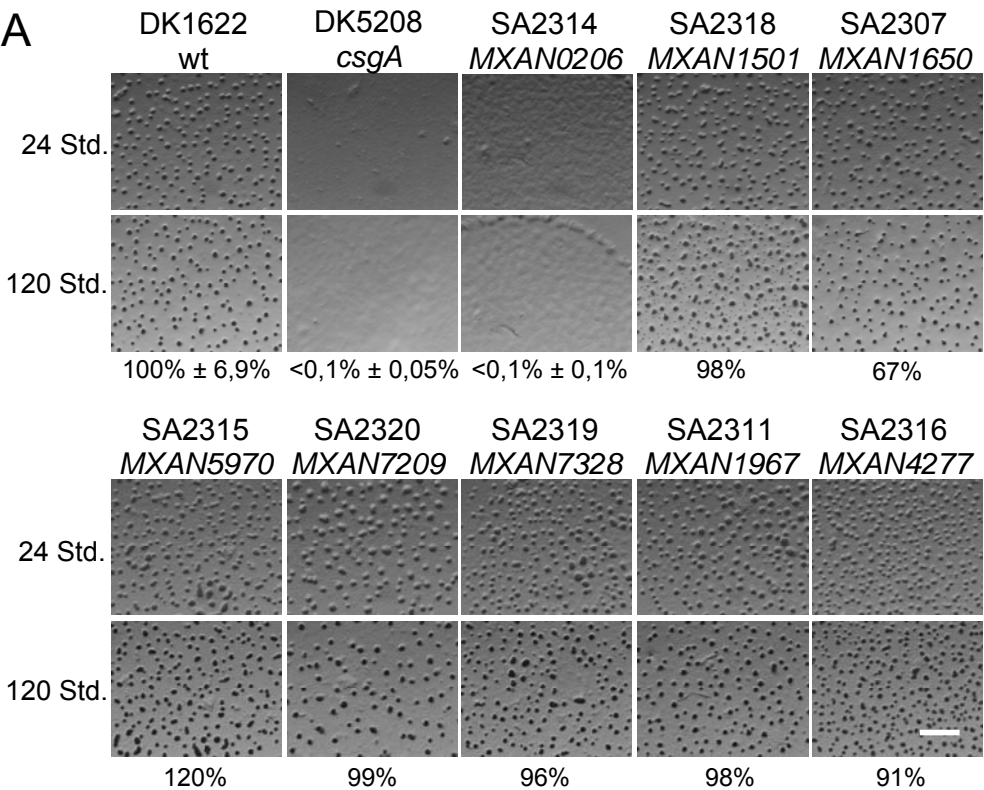
Von den acht ausgewählten Genen werden Insertionsmutanten, wie in 3.5.3 beschreiben, hergestellt. Die Entwicklungsphänotypen der Insertionsmutanten wurden auf TPM-Agar, CF-Agar und in Flüssigkultur („submerged“) untersucht, und die Daten sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Die Medien sind in Tabelle 5 beschrieben. Als Kontrollen wurden der Wildtyp DK1622 und die *csgA*-Mutante DK5208 verwendet.

Auf TPM- und CF-Agar (Abb. 9A/B) sieht man deutlich, dass der Wildtyp DK1622 nach 24 Stunden Fruchtkörper gebildet hat. Im Gegensatz dazu sind in der *csgA*-Mutante DK5208 keine Aggregation und keine Fruchtkörperbildung zu sehen. Sie hat eine Tn-Insertion im *csgA*-Gen und ist somit unfähig, das C-Signal zu bilden. Die Sporulationseffizienz nach 120 Stunden wurde für den Wildtyp DK1622 auf den Wert 100% festgesetzt und die Werte der Mutanten relativ dazu angegeben. Die Sporulationseffizienz von DK5208 beträgt im Vergleich zum Wildtyp $< 0,1\% \pm 0,05\%$. Betrachtet man die Stämme SA2307,

SA2311, SA2315, SA2316, SA2318, SA2319 und SA2320 lässt sich deutlich erkennen, dass ihr Entwicklungsverhalten dem des Wildtyps gleicht. Auch die Sporulationseffizienzen sind annähernd so hoch wie die des Wildtyps. Eine größere Abweichung ist mit nur 67% bei dem Stamm SA2307 auf TPM-Agar zu finden. Schaut man sich den Stamm SA2314 mit einer Insertion im Gen *MXAN0206* an, sieht man besonders auf TPM-Agar einen drastischen Phänotyp. Man sieht selbst nach 120 Stunden nur sehr geringe Aggregation, zudem keine Ausbildung von Fruchtkörpern. Die Sporulationseffizienz beträgt wie bei der *csgA*-Mutante $<0,1\% \pm 0,1\%$. Der Phänotyp entspricht aber nicht exakt dem der *csgA*-Mutante. Auf CF-Agar sieht man bei SA2314 (*MXAN0206*) nach 120 Stunden die Ausbildung von Fruchtkörper-ähnlichen Strukturen. Die Sporulationseffizienz ist mit $44\% \pm 2\%$ allerdings deutlich reduziert.

Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man die Stämme in Flüssigkultur (Abb. 9C) nach 120 Stunden anschaut. Der Wildtyp DK1622 bildet Fruchtkörper, während die *csgA*-Mutante DK5208 nicht aggregiert und keine Fruchtkörper bildet. Die Sporulationseffizienz der *csgA*-Mutante DK5208 beträgt auch in Flüssigkultur $<0,1\% \pm 0,05\%$. Betrachtet man die Stämme SA2307, SA2311, SA2315, SA2316, SA2319 und SA2320 sieht man deutlich, dass sie Fruchtkörper gebildet haben, die denen des Wildtyps gleichen. Die Sporulationseffizienz liegt zwischen 71% und 103%. Betrachtet man den Stamm SA2318 in Flüssigkultur, so lassen sich nur Aggregationszentren erkennen, nicht aber die Ausbildung von Fruchtkörpern. Die Sporulationseffizienz von SA2318 beträgt 71%.

Schaut man sich allerdings wieder den Stamm SA2314 (Abb. 9C) an, dann sieht man auch in Flüssigkultur im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten, der *csgA*-Mutante ähnlichen Phänotyp. Dieser Stamm hat nach 120 Stunden Entwicklung in Flüssigkultur keine Fruchtkörper gebildet, und die Sporulationseffizienz ist mit $2,7\% \pm 0,6\%$ im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert. Aufgrund seines Phänotyps, der dem der *csgA*-Mutante gleicht, und aufgrund seiner Sporulationseffizienzen auf den unterschiedlichen Medien scheint der Stamm SA2314 mit der Insertion in *MXAN0206* ein guter Kandidat für die Serin-Protease PopC zu sein und wird deshalb im folgenden Kapitel genauer untersucht und beschrieben.



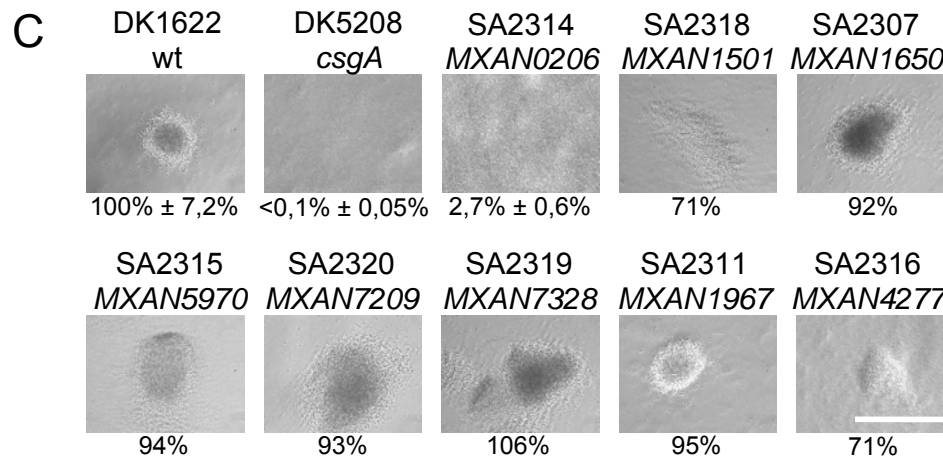


Abbildung 9: Phänotypen der Insertionsmutanten. (A) Entwicklung auf TPM-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. (B) Entwicklung auf CF-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. (C) Entwicklung in Flüssigkultur nach 120 Stunden. Der weiße Balken entspricht 0,2 mm. Zum Vergleich sind neben den Insertionsmutanten der Wildtyp DK1622 und die *csgA*-Mutante DK5208 abgebildet. Die Sporulationseffizienz ist in Prozent angegeben und bei dem Wildtyp DK1622, der *csgA*-Mutante DK5208 und der *MXAN0206* Mutante SA2314 ist die Standardabweichung eingerechnet. Bei den restlichen Mutanten sind die Sporulationseffizienzen aus einem Experiment angegeben, wobei diese durch ein weiteres Experiment bestätigt wurden.

4.2 Untersuchung von *MXAN0206*

Um nähere Informationen über die Struktur des Proteins *MXAN0206* zu bekommen, wurde die Proteinsequenz mit Hilfe des SMART-Servers (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 zu sehen. *MXAN0206* setzt sich aus 475 Aminosäuren zusammen und hat eine kalkulierte molekulare Masse von 51 kDa. C-terminal ist eine 295 Aminosäure-Reste lange PeptidaseS8-Domäne lokalisiert, welche die Subtilase-Domäne darstellt. In der PeptidaseS8-Domäne ist die katalytische Triade mit den für Subtilisine charakteristischen hoch konservierten Aminosäureresten (His, Asp und Ser) zu finden (siehe auch Abb. 16B). Die katalytische Triade ist zudem von hoch konservierten, für Subtilisine typischen Sequenzmotiven umgeben. Im N-terminalen Bereich des Proteins findet man eine Verlängerung von 175 Aminosäure-Resten, welche keinerlei Sequenzähnlichkeit zu bekannten Domänen aufweist. Viele Subtilisine besitzen ein N-terminales Signalpeptid. Dies trifft allerdings nicht für *MXAN0206* zu. Mit dem SignalP-Server konnte in der Proteinsequenz kein Signalpeptid vorhergesagt werden.

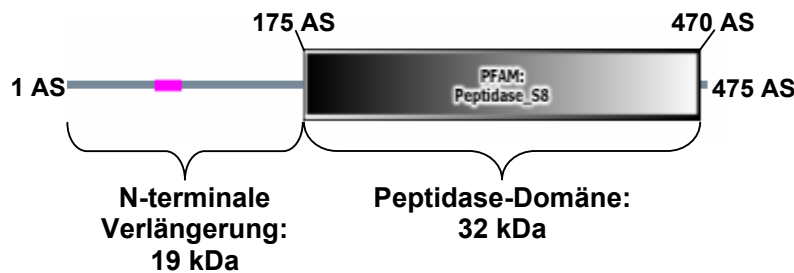


Abbildung 10: Domänenstruktur von MXAN0206. Das Protein MXAN0206 besteht aus 475 Aminosäuren (AS). C-terminal besitzt es eine PeptidaseS8-Domäne, in der auch die katalytische Triade lokalisiert ist. N-terminal hat das Protein eine Verlängerung von 175 Aminosäure-Resten, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Domänen aufweist. MXAN0206 hat kein Signalpeptid (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

4.2.1 Genetischer Kontext von *MXAN0206*

Das Gen, welches für die vermutliche Protease MXAN0206 kodiert, bildet eine Transkriptionseinheit mit einem stromabwärts gelegenen Gen, welches für das konserviert hypothetische Protein MXAN0207 kodiert (Abbildung 11). Weiter stromabwärts befindet sich in gleicher Leserichtung noch ein weiteres Gen (*MXAN0208*), das für ein hypothetisches Protein kodiert. Allerdings beträgt der Abstand zwischen *MXAN0207* und *MXAN0208* 296 bp, so dass man davon ausgehen kann, dass dieses Gen nicht mehr zur Transkriptionseinheit gehört. 613 bp stromaufwärts von *MXAN0206* liegt in entgegen gesetzter Leserichtung das Gen *MXAN0205*, welches für ein Protein kodiert, welches Sequenzähnlichkeiten mit einer Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase zeigt.

Die transkriptionelle Organisation wurde mittels PCR auf cDNA untersucht. Es wurden Oligonukleotide verwendet, um Fragmente innerhalb eines Leserahmens und Fragmente, die überlappende Bereiche zwischen zwei Leserahmen abdecken, amplifizieren zu können. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt. Falls zwei Gene auf demselben Transkript liegen, muß es möglich sein, den Bereich zwischen den beiden offenen Leserahmen zu amplifizieren. Liegen die beiden Gene auf verschiedenen Transkripten, wäre keine Amplifikation möglich.

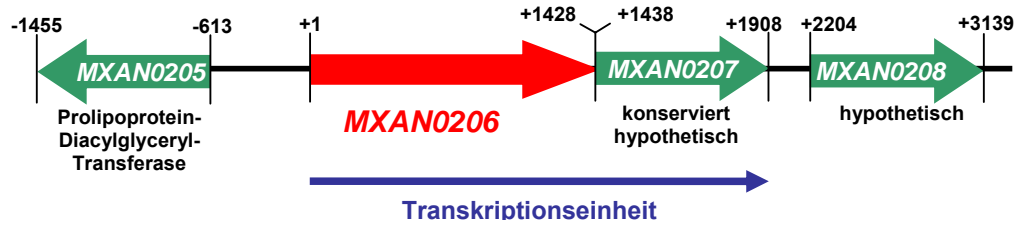


Abbildung 11: Genetischer Kontext von *MXAN0206*. Die Pfeile symbolisieren die offenen Leserahmen. *MXAN0206* ist rot hervorgehoben. Der blaue Pfeil kennzeichnet die Transkriptionseinheit von *MXAN0206* und *MXAN0207*.

Abbildung 12A zeigt die zu überprüfende Transkriptionseinheit mit den oben erwähnten Oligonukleotiden. In Abbildung 12B ist das PCR-Produkt zu sehen, das auf cDNA entsteht, wenn man die Oligonukleotid-Kombinationen *MXAN0206*-803F und *MXAN0206*-873R bzw. *MXAN0207*-280F und *MXAN0207*-339R verwendet. Die Fragmente, die innerhalb des Leserahmens entstehen, haben die erwarteten Größen von 70 bp (Abb. 12B; 1) bzw. 60 bp (Abb. 12B; 2). Das PCR-Fragment, das den überlappenden Bereich zwischen den zwei Leserahmen abdeckt, ist in Abbildung 12C dargestellt. Die Spur 1 (Abb. 12C) zeigt das amplifizierte PCR-Produkt von cDNA. Die Kontrolle mit genomischer DNA ist in Spur 2 (Abb. 12C) zusehen. Für die PCR wurde die Oligonukleotid-Kombination *MXAN0206*-803F und *MXAN0207*-339R verwendet, mit der ein Fragment von ca. 1000 bp entsteht.

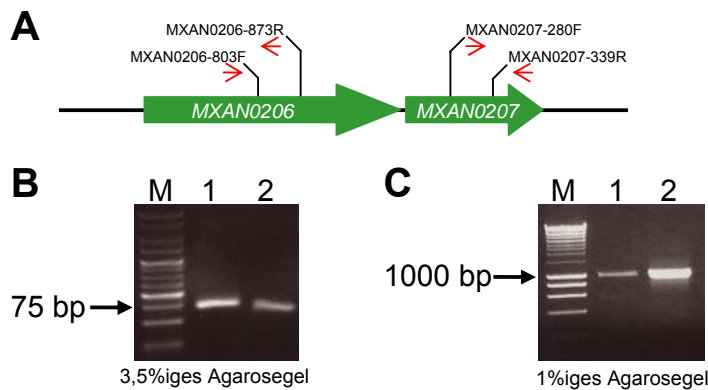


Abbildung 12: Untersuchung der Transkriptionseinheit. (A) zeigt die zu überprüfende Transkriptionseinheit mit den verwendeten Oligonukleotiden. (B) stellt die Fragmente innerhalb eines Leserahmens dar. In Spur 1 ist das PCR-Produkt der Oligonukleotide *MXAN0206*-803F und *MXAN0206*-873R und in Spur 2 das PCR-Produkt der Oligonukleotide *MXAN0207*-280F und *MXAN0207*-339R zu sehen. (C) dokumentiert die Fragmente, die den überlappenden Bereich zwischen den zwei Leserahmen abdecken. In Spur 1 ist das PCR-Produkt der Oligonukleotide *MXAN0206*-803F und *MXAN0207*-339R auf cDNA und in Spur 2 auf genomische DNA zu sehen.

4.2.2 Genetische Komplementation

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, befindet sich das Gen *MXAN0206* in einer Transkriptionseinheit mit dem stromabwärts gelegenen Gen *MXAN0207*. Um ausschließen zu können, dass der drastische Phänotyp der Insertionsmutante *MXAN0206* kein polarer Effekt des stromabwärts gelegenen Gens ist, wurde die Mutante genetisch komplementiert.

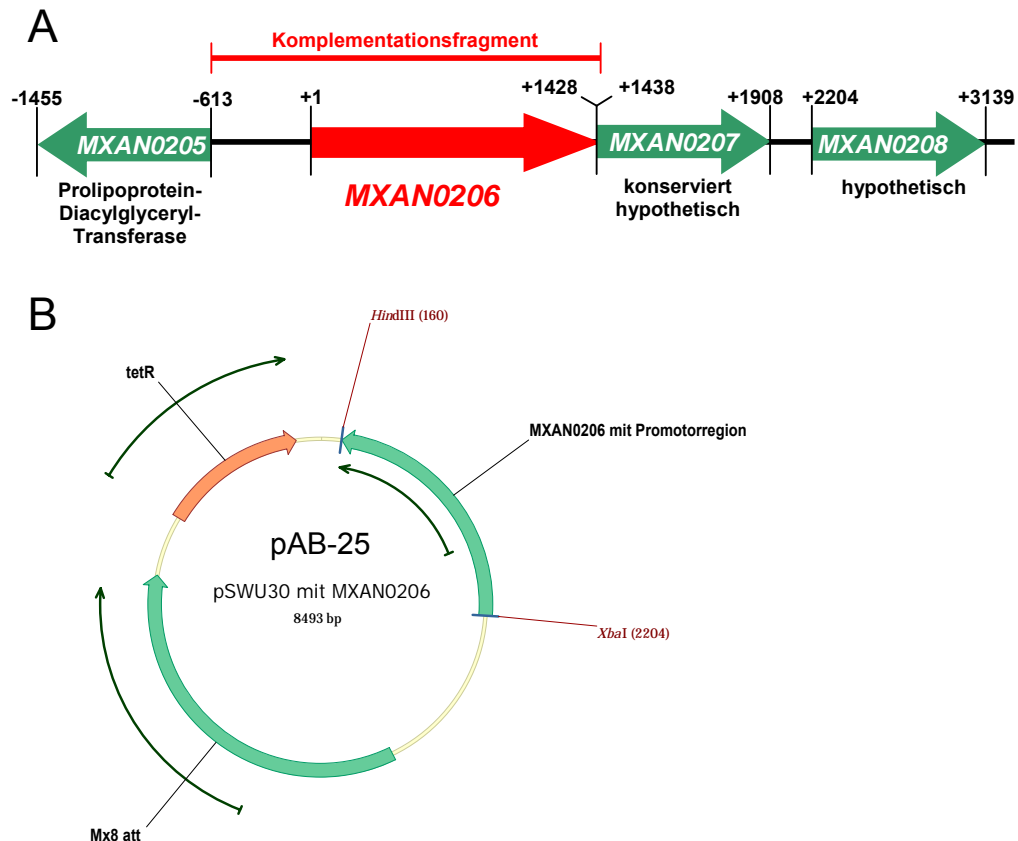


Abbildung 13: Herstellung des Plasmids zur genetischen Komplementation. (A) Das Fragment zur Komplementation ist eingezeichnet. Es umfasst neben dem kompletten Gen *MXAN0206* auch 600 bp von der Promotorregion. **(B)** Dargestellt ist das Plasmid pAB-25, bestehend aus dem Vektor pSWU30 mit dem Komplementationsfragment. Das Plasmid kodiert für eine Tetrazyklin-Resistenz.

Das Plasmid pAB-25 wurde wie in 3.5.8 beschrieben in die Insertionsmutante *MXAN0206* transformiert. Die Integration erfolgte über die „phage Mx8-attB site“ und selektiert wurde auf Kanamycin und Tetrazyklin. Die Kanamycin-Resistenz stammt vom Empfängerstamm (Insertionsmutante *MXAN0206*) und die Tetrazyklin-Resistenz vom Plasmid pAB-25. Die

Komplementationsklone wurden auf die Integration des Plasmids mittels PCR überprüft.

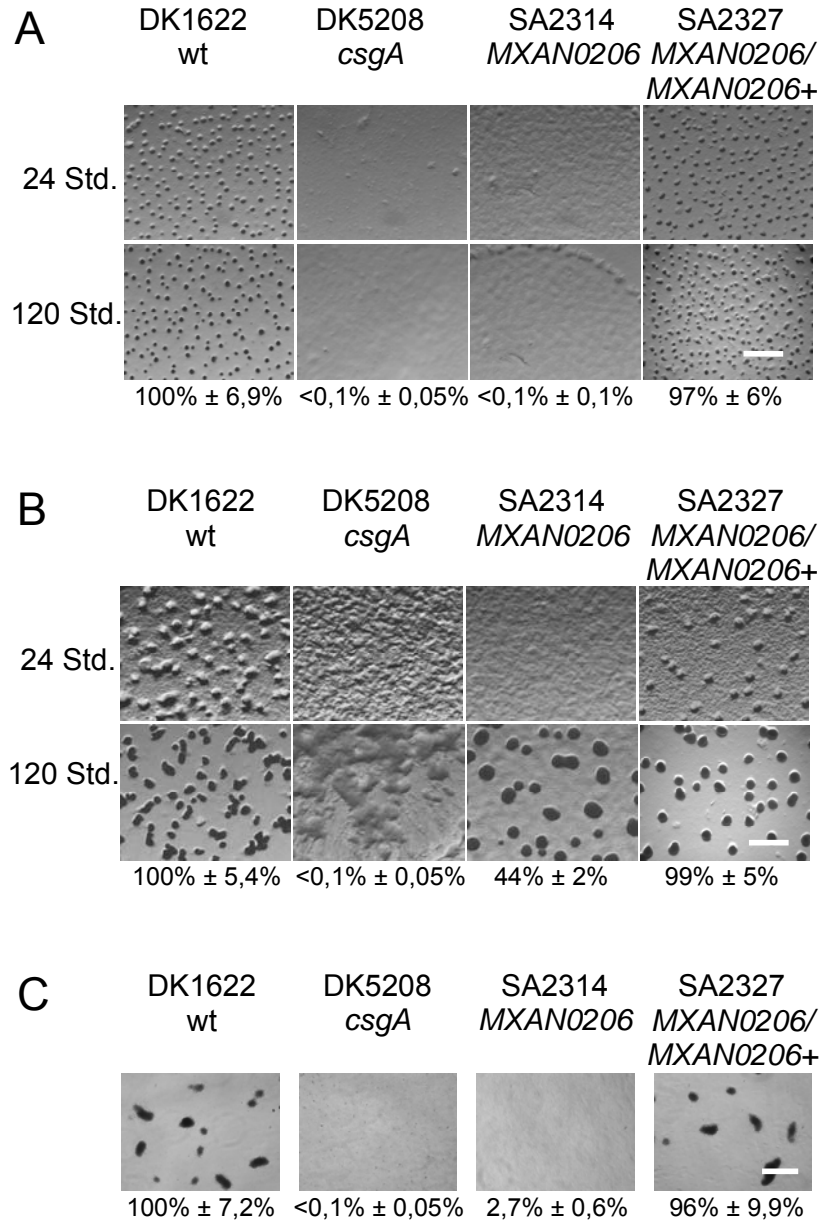


Abbildung 14: Phänotyp des Komplementationsstamms SA2327. (A) Entwicklung auf TPM-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. (B) Entwicklung auf CF-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. (C) Entwicklung in Flüssigkultur nach 120 Stunden. Der weiße Balken entspricht 0,1 mm. Zum Vergleich sind neben dem Komplementationsstamm SA2327 der Wildtyp DK1622, die *csgA*-Mutante DK5208 und die *MXAN0206*-Insertionsmutante SA2314 abgebildet. Die Sporulationseffizienz ist in Prozent unter Berücksichtigung der Standardabweichung angegeben.

Der so entstandene Komplementationsstamm SA2327 wurde auf seine Fähigkeit zur Aggregation, Fruchtkörperbildung und Sporulation überprüft (siehe Abb. 14). Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich der Komplementationsstamm SA2327 auf TPM- (Abb.14A) und CF-Agar (Abb. 14B), als auch in Flüssigkultur (Abb. 14C) wie der Wildtyp verhält. Dessen Sporulationseffizienz liegt je nach Medium zwischen 96% und 99% im Vergleich zum Wildtyp. Die genetische Komplementation hat also funktioniert und man kann sicher sein, dass der Entwicklungsphänotyp der *MXAN0206*-Mutante SA2314 durch die Insertion im Gen *MXAN0206* bedingt ist und nicht durch einen polaren Effekt des stromabwärts liegenden Gens.

4.2.3 Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von *MXAN0206*

Es ist bekannt, dass sich Defekte in der Bewegungsfähigkeit von Mutanten auch auf die Aggregation und Fruchtkörperbildung auswirken. Um ausschließen zu können, dass der Entwicklungsphänotyp von der *MXAN0206*-Mutante nicht auf einen Defekt in der Bewegungsfähigkeit zurückzuführen ist, wurde diese Mutante auf ihre Bewegungsfähigkeit getestet.

Die *MXAN0206*-Mutante wurde zusammen mit den jeweiligen Kontrollen auf 0,5% CTT-Agar (siehe 3.4.6) auf ihre Bewegungsfähigkeit untersucht. Für die S-Bewegungsanalyse wurden 0,5%ige Agar-Platten verwendet, während die A-Bewegung auf 1,5%igen Agar-Platten am besten zu beobachten ist. Als Kontrolle dient zum einen der Stamm DK1217, welcher einen Defekt in der A-Bewegung aufweist und sich nur mit Hilfe des S-Bewegungssystems fortbewegt, zum anderen der Stamm DK1300, welcher sich nur mit Hilfe des A-Bewegungssystem fortbewegt und einen Defekt in der S-Bewegung hat. In Abbildung 15 ist deutlich zu erkennen, dass *MXAN0206* sich sowohl auf 0,5%igem Agar als auch auf 1,5%igem Agar wie der Wildtyp verhält, also A- und S-Bewegungssystem normal funktionieren. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Entwicklungsphänotyp von *MXAN0206* auf einen Defekt in der Bewegung zurückzuführen ist.

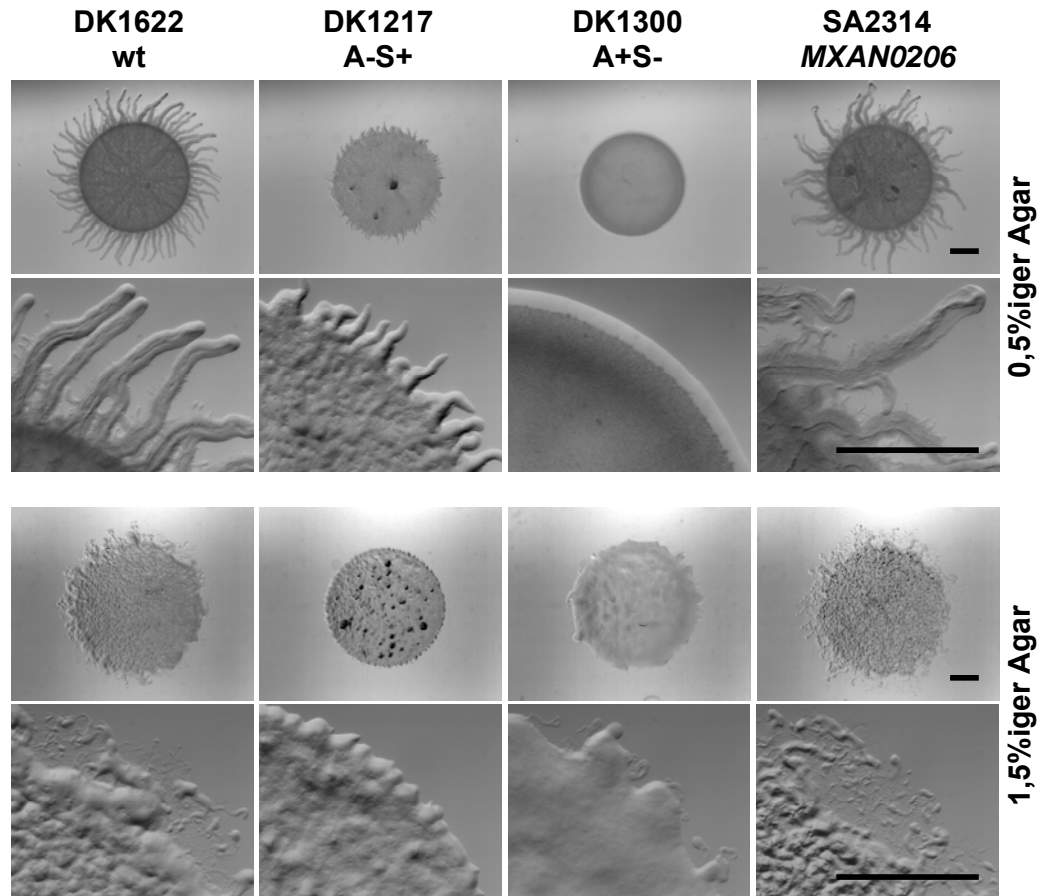


Abbildung 15: Untersuchung der Bewegung von *MXAN0206*. Die Zellen wurden auf 0,5%igen Agar (oben) und 1,5%igen Agar (unten) inkubiert. Nach einer Wachstumsphase von 24 Stunden wurden die Kolonien und ihre Ränder fotografiert. Der schwarze Balken entspricht jeweils 1 mm.

4.2.4 Untersuchung einer *MXAN0206* „Active Site“-Mutante

Um genetisch zu überprüfen, ob die Protease-Aktivität für die Funktion des Proteins *MXAN0206* wichtig ist, wurde eine „Active Site“-Mutante hergestellt. Wie man in dem Sequenzvergleich der Protease-Domänen in Abbildung 16B erkennen kann, zeigt *MXAN0206* die typische katalytische Triade mit den konservierten Sequenzmotiven der Subtilisin-ähnlichen Proteasen. Aus diesem Grund wurde der konservierte Ser-Rest der katalytischen Triade durch einen Ala-Rest ersetzt.

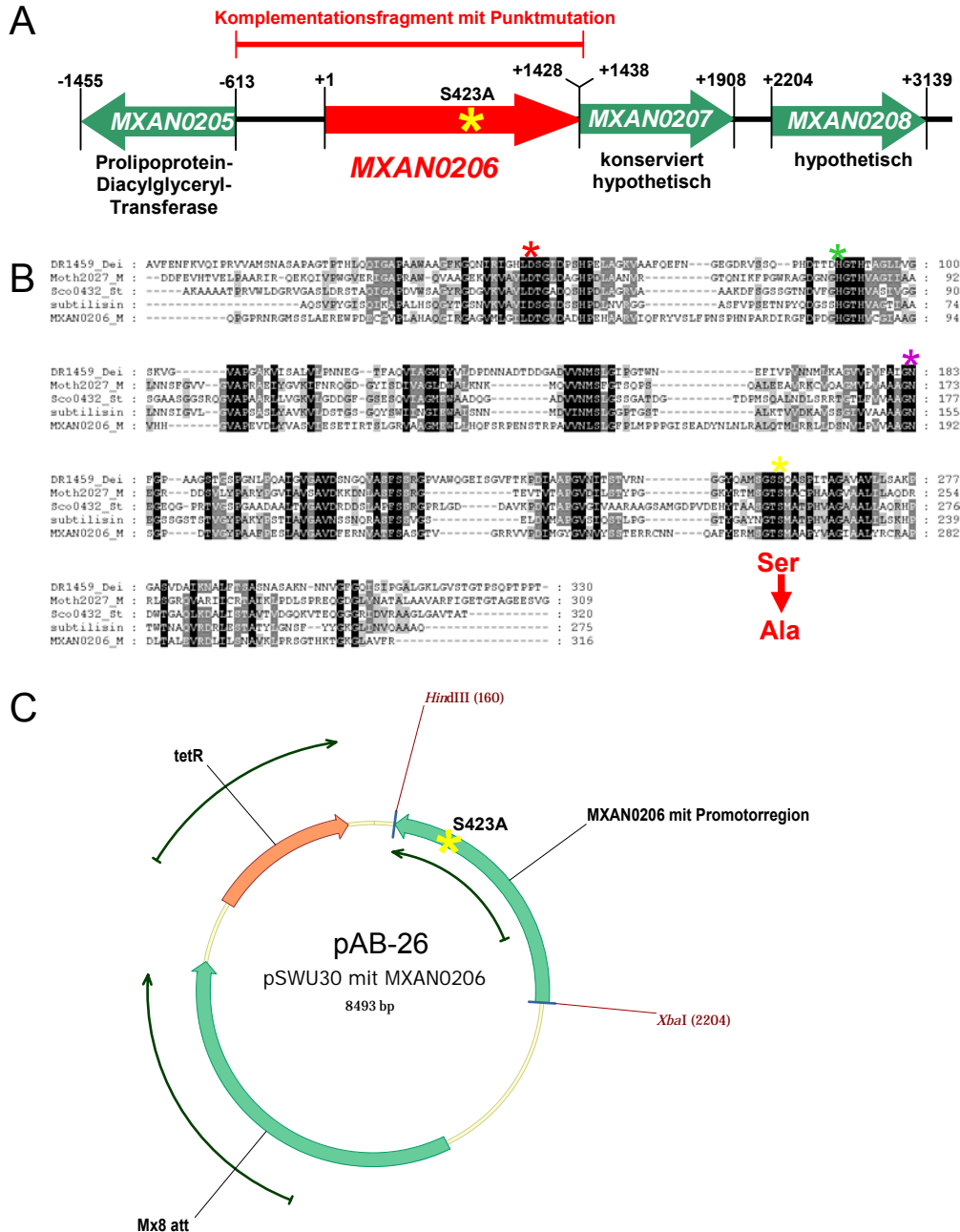


Abbildung 16: Herstellung des Plasmids für die MXAN0206 „Active Site“-Mutante. (A) Das Fragment für die „Active Site“-Mutante ist eingezeichnet. Es umfasst neben dem kompletten Gen MXAN0206 mit der Mutation auch dessen Promotorregion. **(B)** Gezeigt ist hier der Sequenzvergleich der Peptidase-Domäne von MXAN0206 mit Peptidase-Domänen von Subtilisinen aus anderen Bakterien. Aminosäuren, die zu 60% konserviert sind, sind mit schwarzer Schrift auf grauen Hintergrund gekennzeichnet. Aminosäuren, die zu 80% konserviert sind, sind mit weißer Schrift auf grauen Hintergrund markiert. Aminosäuren, die zu 100% konserviert sind, sind schwarz unterlegt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind durch einen farbigen Stern markiert; Aspartat (rot), Histidin (grün) und Serin (gelb). Zusätzlich ist das Asparagin, welches das oxyanionische Loch bildet, in violett gekennzeichnet. **(C)** Dargestellt ist das Plasmid pAB-26, bestehend aus dem Vektor pSWU30 mit MXAN0206^{S423A}, welches für die MXAN0206 „Active Site“-Mutante kodiert. Das Plasmid kodiert außerdem für eine Tetrazyklin-Resistenz.

Das Plasmid pAB-26 wurde wie in 3.5.8 beschrieben in die Insertionsmutante *MXAN0206* transformiert. Die Integration erfolgte über die „phage Mx8-*attB*-site“ und selektiert wurde auf Kanamycin und Tetrazyklin. Die Kanamycin-Resistenz stammt vom Empfängerstamm, d.h. der Insertionsmutante *MXAN0206*, und die Tetrazyklin-Resistenz kommt vom Plasmid pAB-26. Die entstehende Mutante wurde auf die Integration des Plasmids mittels PCR überprüft.

Der so entstandene Stamm SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) wurde auf seine Fähigkeit zur Aggregation und Fruchtkörperbildung überprüft (siehe Abb. 17). Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) auf TPM- (Abb.17A) und CF-Agar (Abb. 17B), als auch in Flüssigkultur (Abb. 17C) ähnlich wie die Insertionsmutante *MXAN0206* verhält. Sie ist auf TPM-Agar und in Flüssigkultur nicht zur Aggregation und zur Fruchtkörperbildung fähig. Auf CF-Agar hingegen sind die Aggregation und die Ausbildung Fruchtkörper-ähnlicher Strukturen zu beobachten. Betrachtet man die Sporulationseffizienz, zeigt sich jedoch sehr deutlich, dass die Werte auf allen drei Medien mit denen der Insertionsmutante *MXAN0206* vergleichbar sind. Somit lässt sich festhalten, dass eine Komplementation mit einem Gen, welches zu einem Protein mit dem Aminosäureaustausch S423A führt, nicht möglich ist. Das lässt vermuten, dass die Protease-Aktivität von essentieller Bedeutung für die Funktion des Proteins *MXAN0206* ist. Um dies zu bestätigen, muß gezeigt werden, dass das Protein *MXAN0206^{S423A}* in der Zelle akkumuliert (siehe 4.2.7).

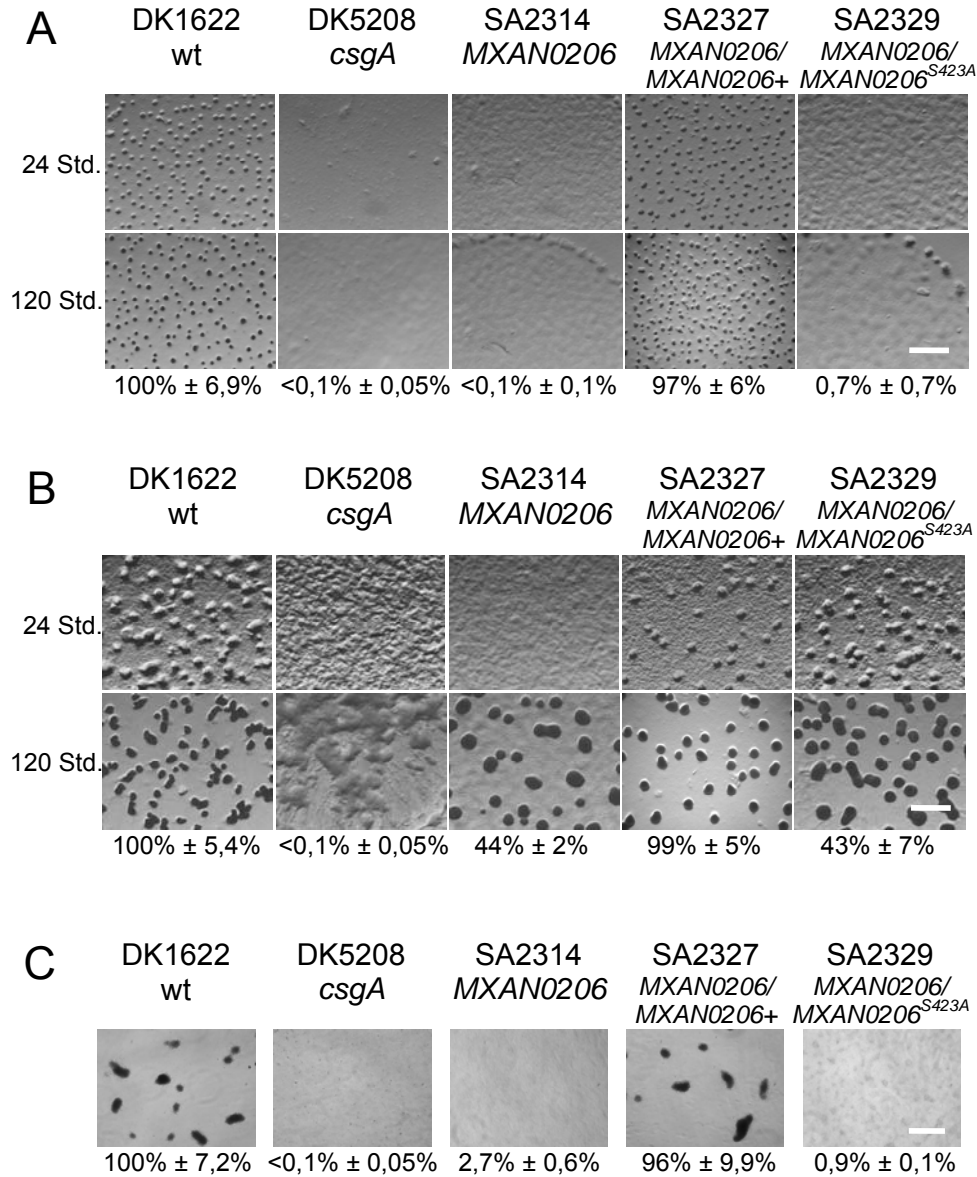


Abbildung 17: Phänotyp der *MXAN0206* „Active Site“-Mutante SA2329. (A) Entwicklung auf TPM-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. **(B)** Entwicklung auf CF-Agar nach 24 Stunden (oben) und 120 Stunden (unten). Der weiße Balken entspricht 1 mm. **(C)** Entwicklung in Flüssigkultur nach 120 Stunden. Der weiße Balken entspricht 0,1 mm. Zum Vergleich sind neben der „Active Site“ Mutante SA2329 der Wildtyp DK1622, die *csgA*-Mutante DK5208, die *MXAN0206*-Insertionsmutante SA2314 und der Komplementationsstamm SA2327 abgebildet. Die Sporulationseffizienz ist in Prozent unter Berücksichtigung der Standardabweichung angegeben.

4.2.5 Akkumulation von p25 und p17 *in vivo*

Da der Entwicklungsphänotyp sowohl des Stamms SA2314 (*MXAN0206*) als auch der Stamms SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) ähnlich dem einer *csgA*-Mutante ist, wurden die beide Stämme auf die Produktion der beiden CsgA-Proteine p25 und p17 überprüft. Vom Wildtyp DK1622, SA2314 (*MXAN0206*) und SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) wurden Proben zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung in Flüssigkultur („submerged“) genommen, auf einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger, wie in 3.6.8 beschrieben, aufgetrennt und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Für die Western Blot Analyse wurde ein Antikörper (α -p25) verwendet, der die komplette Länge des CsgA-Proteins erkennt.

In Abbildung 18 ist diese Western Blot Analyse dargestellt. Im Wildtyp ist p25 bereits in vegetativen Zellen (0 Stunden) zu erkennen. Nach 3 Stunden sieht man auch p17. Die Menge von p17 steigt zwischen 3 Stunden und 18 Stunden an, während nach 24 Stunden nur noch eine schwache p17-Bande zu sehen ist. Im Vergleich dazu ist in SA2314 (*MXAN0206*) in vegetativen Zellen und in sich entwickelnden Zellen nur p25 zu detektieren. Das Gleiche gilt, wenn man diese Western Blot Analyse mit dem Stamm SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) durchführt. Es konnte gezeigt werden, dass *MXAN0206* wichtig für die Akkumulation von p17 ist. Allerdings lässt sich mit diesem Ergebnis nicht zeigen, ob *MXAN0206* p25 direkt oder indirekt spaltet.

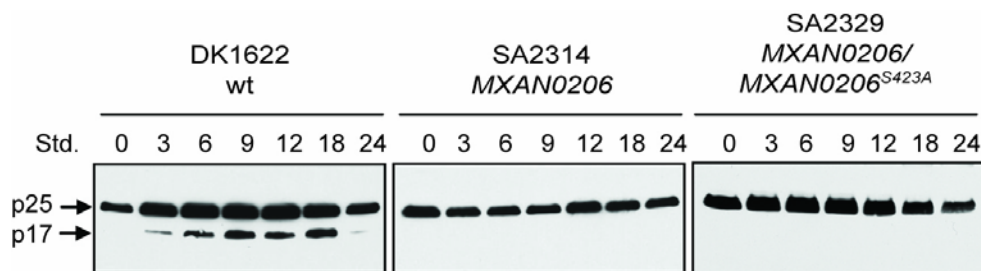


Abbildung 18: Akkumulation von p25 und p17 *in vivo*. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während der Entwicklung geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger aufgetrennt. Die Detektion von p25 und p17 fand mit dem spezifischen Antikörper α -p25 statt. In dieser Western Blot Analyse wurde Gesamt-Zellextrakt verwendet.

4.2.6 Überproduktion und Aufreinigung von MXAN0206

Um die Akkumulation von MXAN0206 *in vivo* überprüfen zu können, wird Antiserum gegen das komplette Protein benötigt. Dazu wurde das MXAN0206 Protein heterolog in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt. Das in 3.5.2 beschriebene Plasmid pAB-27 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) transformiert. Der Vektor pET-24b(+) sorgt dafür, dass MXAN0206 durch die heterologe Expression einen C-terminalen His₆-Tag für die spätere Aufreinigung erhält. Zusammen mit dem *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) hat man ein T7-Polymerase-abhängiges System, das mit IPTG induzierbar ist. Zudem trägt dieser Stamm noch ein Plasmid, welches die Gene für einige seltene tRNAs exprimiert.

Für die Überexpression von MXAN0206 wurde eine Kultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,8 kultiviert und eine Probe entnommen (nicht induzierte Probe; Abb. 19B). Dann wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und für 20 Stunden auf 18°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe entnommen (IPTG-induzierte Kultur; Abb.19B) und die Kultur abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in nativem Lyse-Puffer aufgenommen, mit dem Ultraschall-Gerät aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält die löslichen Proteine (Bahn 3, Abb. 19B). Das Zellzentrifugat wurde in denaturierendem Lyse-Puffer resuspendiert und enthält die unlöslichen Proteine (Bahn 4; Abb. 19B). Auf dem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel ist His₆-MXAN0206 mit einer molekularen Masse von 51 kDa deutlich zu erkennen. Es wird außerdem deutlich, dass His₆-MXAN0206 nicht löslich ist und sich in Einschlusskörpern befindet. Diese Einschlusskörper wurden in denaturierendem Lyse-Puffer mit 8M Harnstoff gelöst und über eine Säule mit Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt.

Dazu wurde His₆-MXAN0206 wie in 3.6.2 beschrieben an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden und der gesamte Ansatz auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde gewaschen (Bahn 5; Abb. 19B), und durch verschiedene Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer (Bahnen 6-11; Abb. 19B) wurde His₆-MXAN0206 von der Ni²⁺-NTA-Agarose verdrängt und somit eluiert. Wie man auf dem SDS-Polyacrylamidgel erkennen kann, wird mit einer Konzentration von 150 mM Imidazol die größte Menge von His₆-MXAN0206 von der Säule eluiert.

Allerdings sieht man in dieser Fraktion noch weitere Banden, die tiefer laufen als His₆-MXAN0206. Diese Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und wie in 3.6.11 beschrieben mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass es sich bei diesen Banden um Abbauprodukte von His₆-MXAN0206 handelt, die bei einer Immunisierung nicht stören sollten. Aus diesem Grund wurde diese Fraktion zur Immunisierung und Herstellung von polyklonalen Antikörper in Kaninchen verwendet. Das Protein wurde zu Eurogentec (Seraing, Belgien) gesandt.

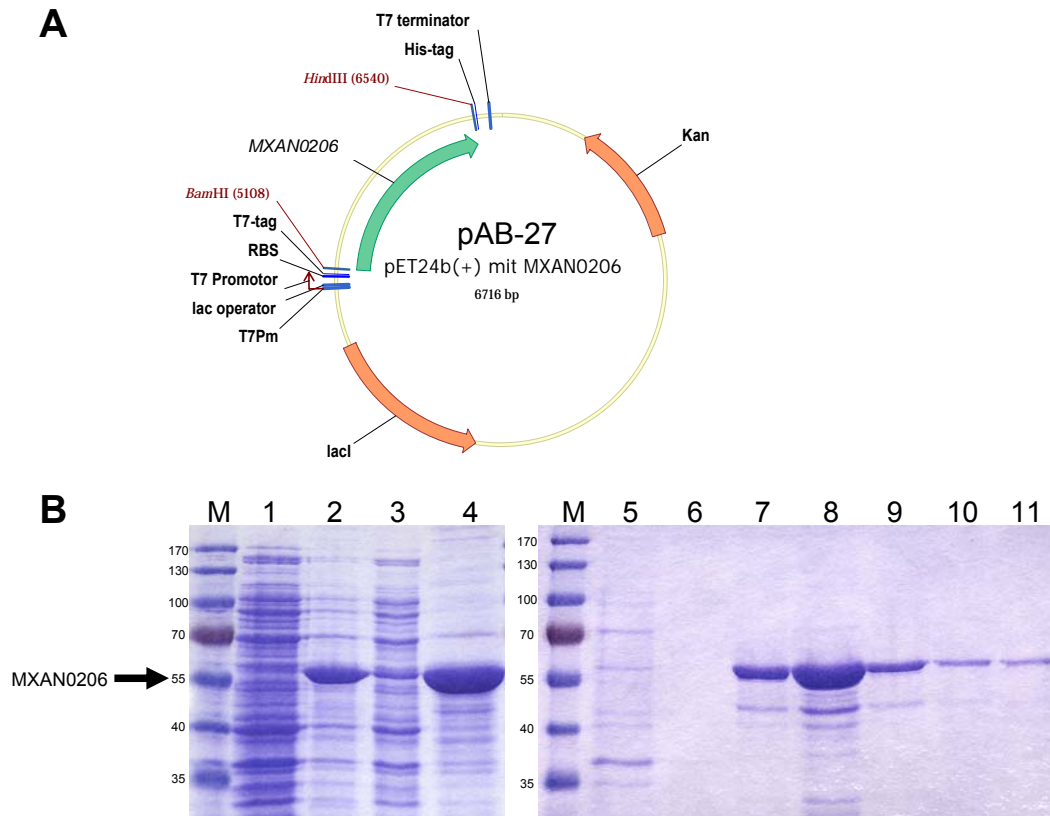


Abbildung 19: Überproduktion und Aufreinigung von His₆-MXAN0206. (A) Dargestellt ist das Plasmid pAB-27, bestehend aus dem Vektor pET-24b(+) mit dem Gen *MXAN0206*. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. (B) Dargestellt ist ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel mit PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) als Molekularmassenstandard. 1: nicht induzierte Kontrolle (t_0); 2: IPTG-induzierte Kultur; 3: lösliche Fraktion nach Aufnahme in den nativen Lyse-Puffer; 4: unlösliche Fraktion nach Aufnahme in den denaturierenden Lyse-Puffer. Diese Fraktion wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Das Resultat ist in den folgenden Bahnen zu sehen. 5: Durchfluss des Waschschritts nach Beladen der Säule; 6: Elution mit 50 mM Imidazol; 7: Elution mit 100 mM Imidazol; 8: Elution mit 150 mM Imidazol; 9: Elution mit 200 mM Imidazol; 10: Elution mit 250 mM Imidazol; 11: Elution mit 500 mM Imidazol.

4.2.7 Akkumulation von MXAN0206 *in vivo*

Das entstandene Antiserum wurde nach einer Affinitätsaufreinigung (siehe 3.6.10) mittels Western Blot Analyse überprüft. Es wurden Proben zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung in Flüssigkultur („submerged“) von DK1622 (Wildtyp), SA2314 (*MXAN0206*) und SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) genommen, auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli aufgetrennt und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde der aufgereinigte Antikörper α -MXAN0206 verwendet.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, erkennt der Antikörper α -MXAN0206 im Wildtyp ein Protein, was nicht im Stamm SA2314 (*MXAN0206*) vorhanden ist. Das Protein hat die korrekte molekulare Masse von 51 kDa. Somit ist der Antikörper α -MXAN0206 spezifisch. Man kann allerdings auch eine Abnahme der Menge an MXAN0206 Protein während der Entwicklung beobachten.

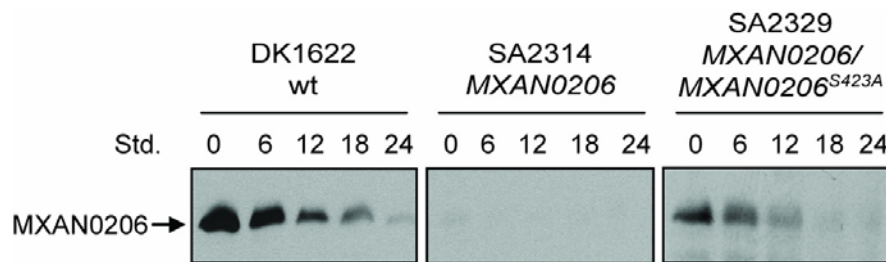


Abbildung 20: Akkumulation von MXAN0206 *in vivo*. Im Wildtyp und in *MXAN0206/MXAN0206^{S423A}* wird MXAN0206 detektiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während der Entwicklung geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli aufgetrennt. Es wurde Protein von gleichen Mengen an Zellen aufgetragen. Die Detektion von MXAN0206 fand mit dem Antikörper α -MXAN0206 statt. In dieser Western Blot Analyse wurde Gesamt-Zellextrakt verwendet.

In der „Active Site“-Mutante SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) ist ein ähnliches Bild zu beobachten. MXAN0206 lässt sich ebenfalls detektieren, und die Menge an Protein nimmt während der Entwicklung ab. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Menge an MXAN0206 leicht reduziert. Diese Western Blot Analyse zeigt uns also, dass im Stamm SA2329 (*MXAN0206/MXAN0206^{S423A}*) das MXAN0206 Protein vorhanden ist. Wie man bereits in 4.2.5 sehen konnte, führt der Austausch von Ser423 zu einem inaktiven Protein, da kein p17 detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die Protease Aktivität von MXAN0206 essentiell ist.

Um mehr über die Akkumulation des Proteins MXAN0206 zu erfahren, wurde dessen Akkumulation auch in anderen bekannten Entwicklungsmutanten *in vivo* untersucht. Abbildung 21 zeigt die Akkumulation von MXAN0206 in der *csgA*-Mutante (DK5208), der *asgA*-Mutante (DK5057), der *asgB*-Mutante (DK9013), der *fruA*-Mutante (DK11063) und der *relA*-Mutante (DK527) im Vergleich zum Wildtyp (DK1622). Wie man deutlich erkennen kann, akkumuliert MXAN0206 in der *csgA*-Mutante genauso wie im Wildtyp. In der *fruA*-Mutante und der *relA*-Mutante hingegen scheint die Akkumulation von MXAN0206 gleichmäßiger als im Wildtyp zu sein. Man kann in diesen beiden Mutanten nach 24 Stunden noch deutlich eine MXAN0206-Bande erkennen. Im Unterschied dazu ist MXAN0206 in den Mutanten *asgA* und *asgB* gar nicht zu detektieren, d.h. MXAN0206 akkumuliert in diesen beiden Mutanten nicht.

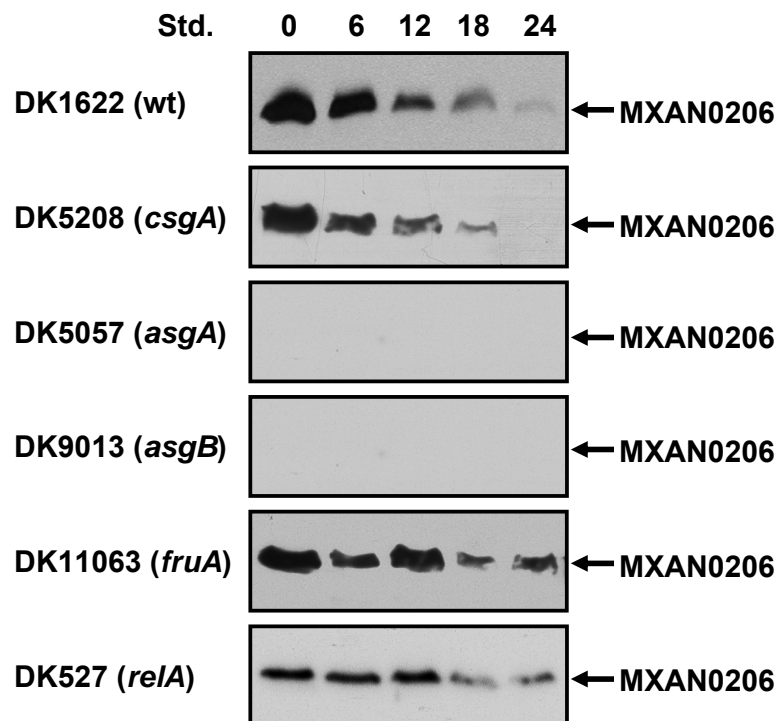


Abbildung 21: Akkumulation von MXAN0206 in verschiedenen Entwicklungsmutanten *in vivo*. Die gezeigten Stämme wurden in Flüssigkultur entwickelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während der Entwicklung geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli aufgetrennt. Es wurde Protein von gleichen Mengen an Zellen aufgetragen. Die Detektion von MXAN0206 fand mit dem Antikörper α -MXAN0206 statt. In dieser Western Blot Analyse wurde Gesamt-Zellextrakt verwendet.

4.2.8 Subzelluläre Lokalisation und Sekretion von MXAN0206

Wie man bereits in 4.2.7 sehen konnte, nimmt die Menge an MXAN0206 in der Zelle während der Entwicklung ab. Dies lässt darauf schließen, dass MXAN0206 entweder sekretiert oder während der Entwicklung abgebaut wird. Da wir bei diesem Versuch Gesamt-Zellextrakt verwendet haben, können wir keine Aussage über die Lokalisation von MXAN0206 in der Zelle machen. Daher wurde, wie in 3.6.4 beschrieben, eine Zellfraktionierung mit Wildtyp-Zellen und *MXAN0206*-Zellen (SA2314) als Negativkontrolle durchgeführt. Das Experiment wurde sowohl mit vegetativen als auch mit hungernden Zellen durchgeführt. Ein Unterschied konnte aber nicht festgestellt werden, aus diesem Grund ist in Abbildung 22A nur die Zellfraktionierung von vegetativen Zellen gezeigt.

Wie in Abbildung 22A zu sehen ist, lässt sich, wie erwartet, MXAN0206 im Gesamt-Zellextrakt des Wildtyps DK1622 und nicht in dem von SA2314 (*MXAN0206*) detektieren. Nach der Fraktionierung wird MXAN0206 nur in der löslichen Fraktion detektiert, d.h., dass es sich bei MXAN0206 um ein zytoplasmatisches bzw. periplasmatisches Protein handeln muss. Die Menge an Protein ist allerdings in der löslichen Fraktion geringer als im Gesamt-Zellextrakt. Kontrollexperimente mit dem zytoplasmatischen Protein RomR, mit dem in der äußeren Membran lokalisierten p25 und PilC, ein Protein der inneren Membran, haben gezeigt, dass die Zellfraktionierung korrekt funktioniert hat (Daten werden hier nicht gezeigt).

Nun musste überprüft werden, ob MXAN0206 während der Entwicklung sekretiert wird. Um diese Möglichkeit zu analysieren, wurde, wie in 3.6.5 beschrieben, zell-freier Überstand von Wildtyp-Zellen (DK1622) und *MXAN0206*-Zellen (SA2314) unter vegetativen und hungernden Bedingungen isoliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 22B zu sehen. MXAN0206 wurde nur im Überstand von hungernden Zellen, nicht aber von vegetativen Zellen des Wildtyps erkannt. In der Negativkontrolle mit *MXAN0206*-Zellen konnte das Protein nicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass MXAN0206 in hungernden Zellen sekretiert wird.

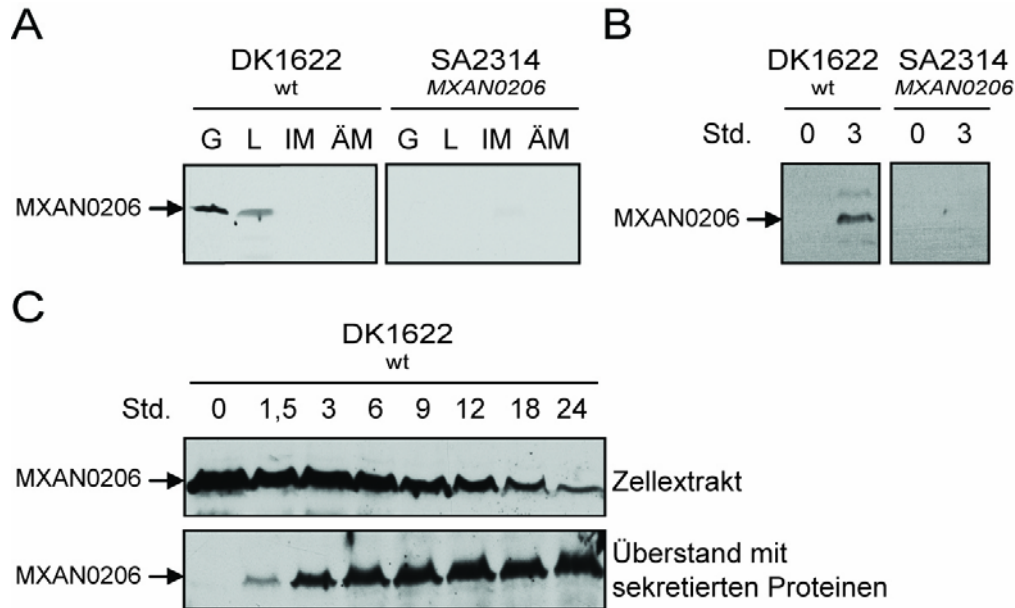


Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation von MXAN0206. (A) Fraktionierung von vegetativen Wildtyp-Zellen (DK1622) und *MXAN0206*-Zellen (SA2314). G: Gesamt-Zellextrakt; L: Lösliche Fraktion; IM: Fraktion der inneren Membran; ÄM: Fraktion der äußeren Membran. Auf das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel wurde Protein von gleichen Mengen an Zellen aufgetragen. (B) Sekretion von MXAN0206 in vegetativen (0 Std.) und hungernden (3 Std.) Zellen. Auf das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel wurde Gesamt-Protein von gleichen Mengen an Zellen und Überstand aufgetragen. (C) Sekretion von MXAN0206 über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Auf das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel wurde Gesamt-Protein von gleichen Mengen an Zellen und Überstand aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass MXAN0206 nach 3 Stunden extrazellulär lokalisiert ist. Von der p17-Produktion im Wildtyp (Abb.18) weiß man, dass die Menge an p17 zwischen 9 und 18 Stunden ein Maximum erreicht. Um eine Korrelation der MXAN0206-Sekretion mit der p17-Produktion herstellen zu können, war es notwendig, die MXAN0206-Sekretion über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Das Ergebnis ist in Abbildung 22C zu sehen. Es wurde erneut zell-freier Überstand von hungernden Wildtyp-Zellen (DK1622) isoliert, diesmal allerdings zu bestimmten Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden. Parallel zum Überstand wurde auch der Zellextrakt vom Wildtyp zu diesen Zeitpunkten gesammelt und in einer Western Blot Analyse untersucht. Auf das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel wurde Gesamt-Protein von gleichen Mengen an Zellen und Überstand aufgetragen. Wenn man den Zellextrakt betrachtet, ist deutlich zu erkennen, dass die Menge an MXAN0206 kontinuierlich abnimmt. Schaut man sich im Vergleich dazu den Überstand, der

die sekretierten Proteine enthält, an, fällt auf, dass die Menge von sekretiertem MXAN0206 synchron zur Abnahme von MXAN0206 im Zellextrakt ansteigt. Somit kann man argumentieren, dass in dem Zeitraum zwischen 9 und 18 Stunden, in dem die p17-Produktion gipfelt, auch die Menge an sekretiertem MXAN0206 ansteigt.

4.2.9 p25 wird von MXAN0206 *in vitro* direkt gespalten

Alle bis hier vorgestellten und beschriebenen Experimente weisen darauf hin, dass es sich bei MXAN0206 möglicherweise um die Serin-Protease PopC handelt. Um sich dessen aber wirklich sicher sein zu können, musste gezeigt werden, dass MXAN0206 p25 direkt spaltet. Dazu wurde der in 3.6.7 beschriebene *in vitro* Protease-Assay verwendet.

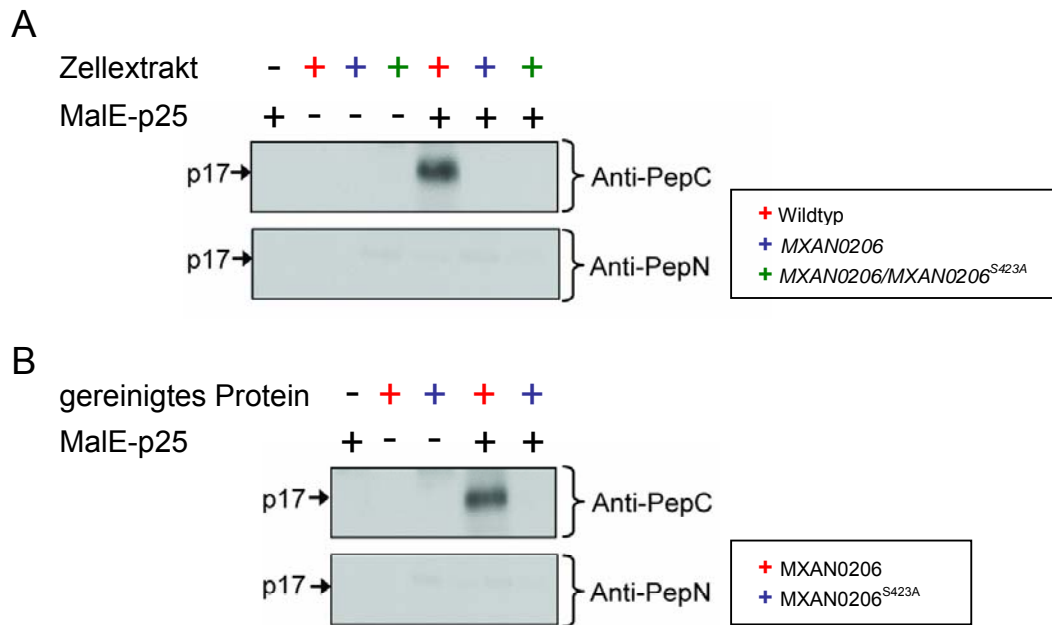


Abbildung 23: *In vitro* Protease-Assay. (A) p25 wird *in vitro* mit Wildtyp-Zellextrakt gespalten. Gesamt-Zellextrakt vom Wildtyp (DK1622), der MXAN0206 Mutante (SA2314) und der MXAN0206/MXAN0206^{S423A} „Active Site“-Mutante (SA2329), welche für 9 Stunden dem Hungerzustand ausgesetzt waren, wurden jeweils mit dem aus *E. coli* aufgereinigten Fusionsprotein MalE-p25 inkubiert. Es wurden Antikörper gegen den C-terminalen (oben) und N-Terminalen (unten) Teil von CsgA verwendet. (B) p25 wird von MXAN0206 *in vitro* direkt gespalten. Aufgereinigtes MXAN0206 und MXAN0206^{S423A} wurden mit MalE-p25 gemischt und inkubiert. Es wurden Antikörper gegen den C-terminalen (oben) und N-Terminalen (unten) Teil von p25 verwendet.

Gesamt-Zellextrakt vom Wildtyp (DK1622), der *MXAN0206*-Mutante (SA2314) und der *MXAN0206/MXAN0206*^{S423A} „Active Site“-Mutante (SA2329), welche für 9 Stunden dem Hungerzustand ausgesetzt waren, wurden jeweils mit dem aus *E. coli* aufgereinigten Fusionsprotein MalE-p25 gemischt und inkubiert. In dem Ansatz von Wildtyp-Zellextrakt und MalE-p25 konnte in einer Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Teil von p25 ein Protein mit der molekularen Masse von 17 kDa nachgewiesen werden (Abb. 23A, oben). Dieses Protein konnte mit einem Antikörper gegen den N-terminalen Teil von p25 nicht detektiert werden, was die Identität von p17 bestätigt. Wurde Zellextrakt von der *MXAN0206*-Mutante (SA2314) bzw. der *MXAN0206/MXAN0206*^{S423A} „Active Site“-Mutante (SA2329) verwendet, wurde p17 nicht von dem C-terminalen Antikörper erkannt. Dies deutet daraufhin, dass die Protease, die MalE-p25 spaltet, nur im Wildtyp-Zellextrakt vorhanden ist und nicht im Zellextrakt der beiden Mutanten. Allerdings gibt das Experiment keinen Aufschluss darüber, ob *MXAN0206* p25 direkt spaltet.

Um mit dem *in vitro* Protease-Assay die direkte Spaltung von p25 durch *MXAN0206* zu beweisen, brauchte man sowohl das *MXAN0206*-Protein nativ aufgereinigt als auch das *MXAN0206*^{S423A}-Protein als Negativkontrolle. Dazu wurden die beiden Rosetta2 (DE3)-Stämme mit den Plasmiden pAB-27 (siehe Abb. 19A; pET-24b(+)) mit *MXAN0206*) und pAB-36 (pET-24b(+)) mit *MXAN0206*^{S423A}) konstruiert und verwendet. Die Gene für die His₆-Proteine wurden überexprimiert, die Einschlusskörper des jeweiligen Proteins aufgereinigt und diese danach wie in 3.6.3 beschrieben zurückgefaltet. Dieses Vorgehen war nötig, da *MXAN0206* nicht löslich ist. Wie Abbildung 23B zeigt, wird in dem Ansatz mit MalE-p25 und His₆-*MXAN0206* p17 gebildet. Dass es sich dabei wirklich um p17 handelt, sieht man daran, dass es mit dem N-terminalen Antikörper nicht zu detektieren ist. Im dem Ansatz MalE-p25 mit His₆-*MXAN0206*^{S423A} wird kein p17 erkannt. Somit wurde bewiesen, dass *MXAN0206* p25 *in vitro* direkt zu p17 spaltet.

4.2.10 Extrazelluläre Komplementation in Flüssigkultur

In diesem Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die *MXAN0206*-Mutante (SA2314) mit Wildtyp-Zellen (DK1622) bzw. Zellen der

csgA-Mutante (DK5208) extrazellulär zu komplementieren. Dazu wurden *MXAN0206*-Zellen (SA2314) mit Wildtyp-Zellen (DK1622) bzw. Zellen der *csgA*-Mutante (DK5208) in Flüssigkultur im Verhältnis 1:1 gemischt und ihre Entwicklung dokumentiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 zu sehen. Zum Vergleich sind in der oberen Reihe die Phänotypen des Wildtyps (DK1622), der *csgA*-Mutante (DK5208) und der *MXAN0206*-Mutante (SA2314) allein nach 120 Stunden zu sehen. Als Positivkontrolle dieses Experimentes dient der Ansatz mit Wildtyp-Zellen (DK1622) und Zellen der *csgA*-Mutante (DK5208) (Abb. 24, untere Reihe links). Von diesem Ansatz weiß man, dass der Wildtyp die Entwicklung der *csgA*-Mutante extrazellulär vollständig komplementieren kann. Dies ist auch hier der Fall, denn die Zellen sind zur Aggregation und Fruchtkörperbildung fähig und die Sporulationseffizienz liegt bei 97%. Es erfolgt allerdings keine extrazelluläre Komplementation, wenn man Wildtyp-Zellen mit *MXAN0206*-Zellen (Abb. 24, untere Reihe mitte) bzw. Zellen der *csgA*-Mutante mit *MXAN0206*-Zellen (Abb. 24, untere Reihe rechts) mischt. In beiden Fällen sieht man eine leichte Aggregation, aber echte Fruchtkörper werden nicht gebildet.

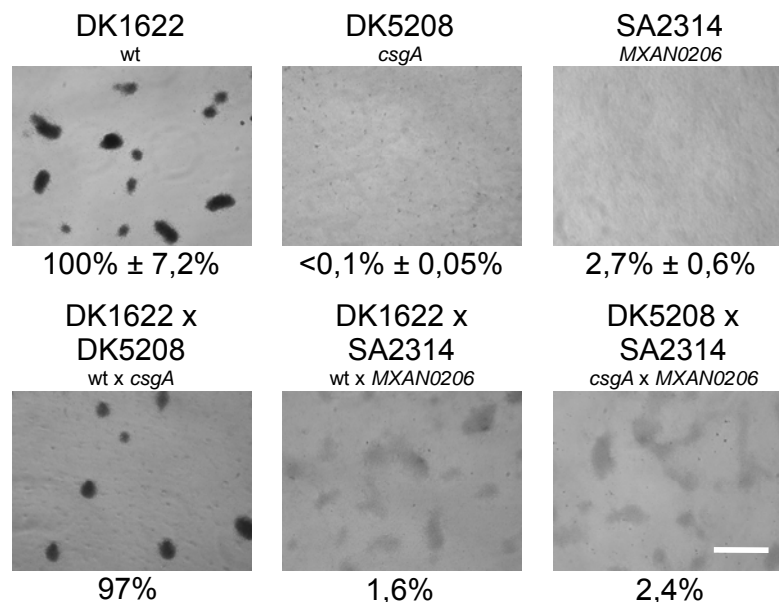


Abbildung 24: Phänotypen der extrazellulären Komplementation in Flüssigkultur. Entwicklung in Flüssigkultur nach 120 Stunden. Zum Vergleich sind neben den Komplementationsansätzen der Wildtyp DK1622, die *csgA*-Mutante DK5208 und die *MXAN0206*-Mutante SA2314 abgebildet. Der weiße Balken entspricht 0,1 mm. Die Sporulationseffizienz ist in Prozent (bei DK1622, DK5208 und SA2314 unter Berücksichtigung der Standardabweichung) angegeben.

4.3 Untersuchung des stromabwärts liegenden Gens *MXAN0207*

Wir konnten zeigen, dass *MXAN0206* sekretiert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass p25 ein direktes Substrat für *MXAN0206* darstellt und wir davon ausgehen können, dass dieser Prozess außerhalb der Zelle stattfindet. Also muss es eine Regulation der Sekretion geben, denn *MXAN0206* wird nur während der Entwicklung exportiert. Diese Sekretion von *MXAN0206* verläuft wahrscheinlich über ein Typ-I- bzw. Typ-III-Sekretionssystem, da *MXAN0206* kein Signalpeptid besitzt. Dabei kann man an zwei Arten der Regulation denken. Zum einen könnte in vegetativen Zellen das Sekretionssystem nicht vorhanden sein, während dieses während der Entwicklung synthetisiert wird und *MXAN0206* exportiert werden kann. Zum anderen könnte man sich einen Protein-Komplex vorstellen, welcher *MXAN0206* in vegetativen Zellen inaktiv hält und am Export hindert. Beim Eintritt in die Hungerphase wird das *MXAN0206*-Protein aus dem Protein-Komplex entlassen und exportiert. Wie wir in 4.2.1 zeigen konnten, bilden *MXAN0206* und *MXAN0207* eine Transkriptionseinheit. Bei *MXAN0207* handelt es sich um ein sehr kleines Protein von ca. 16 kDa. Um nähere Informationen über die Struktur des Proteins zu bekommen, wurde die Proteinsequenz mit Hilfe des SMART-Servers (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) bzw. mit BLASTp analysiert. Allerdings weist das Protein *MXAN0207* keinerlei Sequenzähnlichkeit zu konservierten Proteinen bzw. Domänen auf. Aufgrund der Tatsache, dass es mit *MXAN0206* eine Transkriptionseinheit bildet, könnte es ein Kandidat für den oben erwähnten Protein-Komplex mit *MXAN0206* sein. Um diese Hypothese zu stützen, wurde es näher untersucht.

4.3.1 Herstellung einer „in frame“ Deletionsmutante von *MXAN0207*

Da es sich bei *MXAN0207* um ein sehr kleines Gen von 472 bp handelt, ist das Herstellen einer Insertionsmutante nicht möglich. Denn für die homologe Rekombination während der Konstruktion einer Insertionsmutante benötigt man schon mindestens ein 500 bp großes, zentrales Fragment des Gens. Deshalb haben wir uns für eine „in frame“ Deletion des *MXAN0207* Gens entschieden.

Die Konstruktion einer „in frame“ Deletionsmutante von *MXAN0207* ist in Abbildung 25 dargestellt. Es wurden zunächst zwei Fragmente, die das zu

mutierende Gen flankieren, mittels PCR mit den Oligonukleotiden A MXAN0207 *HindIII* for und B MXAN0207 rev bzw. C MXAN0207 for und D MXAN0207 *XbaI* rev amplifiziert. Diese Oligonukleotide waren so gewählt, dass die beiden PCR-Produkte als Template in einer zweiten PCR mit den Oligonukleotiden A MXAN0207 *HindIII* for und D MXAN0207 *XbaI* rev dienen konnten, um so ein Fusionsprodukt aus beiden zu amplifizieren. Dieses wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* in den Vektor pBJ114 kloniert, welcher neben einer Resistenz gegen Kanamycin auch das *galK* Gen trägt, dessen Gen-Produkt in Anwesenheit von Galaktose zur Synthese eines toxischen Produkt führt. Der resultierende Vektor wurde in den Wildtyp DK1622 transformiert, wo es zu einer homologen Rekombination in einer der beiden flankierenden Regionen von *MXAN0207* kam. Nach Inkubation bei 32°C wurden Transformanten vereinzelt und deren Genotyp durch die Resistenz gegen Kanamycin und durch die PCR mit den Oligonukleotiden E MXAN0207 for und dem Oligonukleotid fwd bzw. F MXAN0207 rev und dem Oligonukleotid rev bestätigt. Mit der so erzeugten Insertionsmutante wurde ein „loop out“ durchgeführt (siehe 3.5.3) um eine „in frame“ Deletionsmutante von *MXAN0207* zu erzeugen.

Hierzu ist zu sagen, dass Insertionsmutanten konstruiert wurden, die sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des Gens *MXAN0207* integriert waren, allerdings nach dem sogenannten „loop out“ des Plasmids immer nur der Wildtyp entstand. Das wurde mehrfach mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Dies deutet darauf hin, dass die Deletion des Gens *MXAN0207* möglicherweise letal sein könnte. Um diese Vermutung zu verifizieren, müsste man über die „phage Mx8 *attB* site“ eine Kopie des *MXAN0207*-Gens in den Wildtyp DK1622 bringen und vor diesem Hintergrund die „in frame“ Deletion am Genort des Wildtyps noch einmal versuchen. Wenn es dann möglich ist eine „in frame“ Deletion von *MXAN0207* herzustellen, kann man davon ausgehen, dass die Deletion im Wildtyp-Hintergrund letal ist. Zudem müsste auch eine „in frame“ Deletion von *MXAN0206/MXAN0207* konstruiert werden.

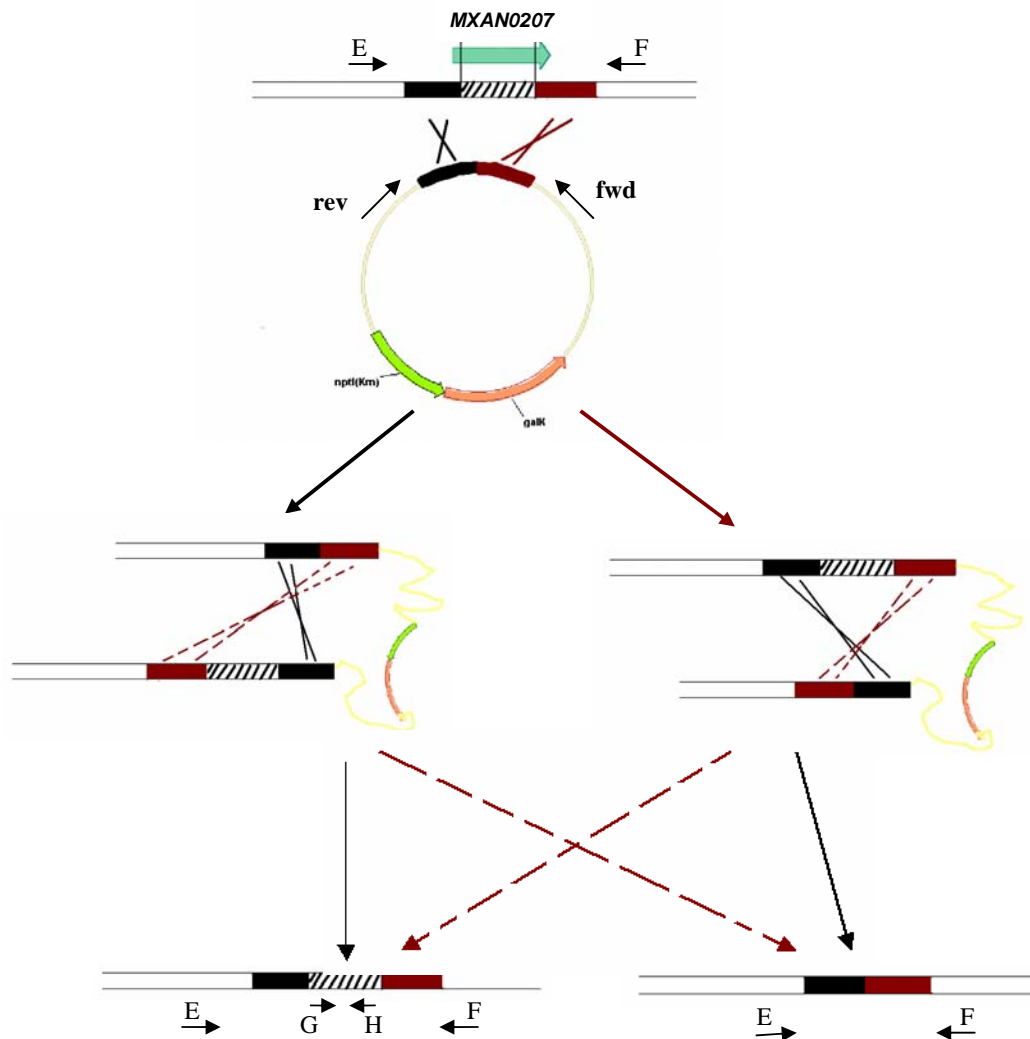


Abbildung 25: Strategie der Konstruktion einer „in frame“ Deletionsmutante von *MXAN0207*. Eine nähere Beschreibung dieses Schemas befindet sich im Text.

4.3.2 Überproduktion und Aufreinigung von *MXAN0207*

Um Antiserum gegen das komplette *MXAN0207*-Protein zu bekommen, war es nötig, das Protein heterolog in *E. coli* zu produzieren und aufzureinigen. Das in 3.5.2 beschriebene Plasmid pAB-51 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) transformiert.

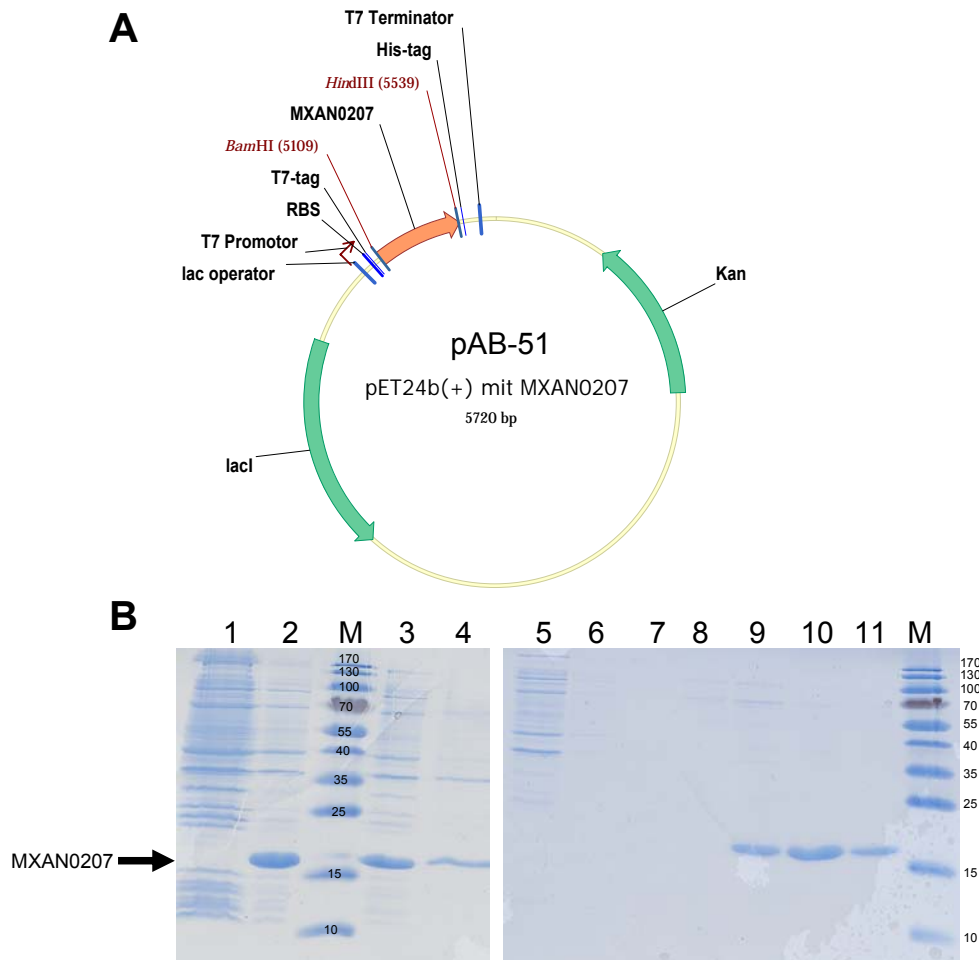


Abbildung 26: Überproduktion und Aufreinigung von His₆-MXAN0207. (A) Dargestellt ist das Plasmid pAB-51, bestehend aus dem Vektor pET-24b(+) mit dem Gen *MXAN0207*. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. (B) Es ist ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Als Molekularmassenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot). 1: nicht induzierte Kontrolle (t_0); 2: IPTG-induzierte Kultur; 3: lösliche Fraktion nach Aufnahme in den nativen Lyse-Puffer; 4: unlösliche Fraktion nach Aufnahme in den denaturierenden Lyse-Puffer. Diese Fraktion wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Das Resultat ist in den folgenden Bahnen zu sehen. 5: Durchfluss des Waschschritts; 6: Elution mit 50 mM Imidazol; 7: Elution mit 100 mM Imidazol; 8: Elution mit 150 mM Imidazol; 9: Elution mit 200 mM Imidazol; 10: Elution mit 250 mM Imidazol; 11: Elution mit 500 mM Imidazol.

Für die Überexpression wurde eine Kultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,8 kultiviert und eine Probe entnommen (nicht induzierte Probe; Abb. 26B). Dann wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und für 20 Stunden bei 18°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe entnommen (IPTG-induzierte Kultur; Abb. 26B) und die Kultur abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in nativem Lyse-Puffer aufgenommen, mittels Ultraschall aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält die

löslichen Proteine (Bahn 3, Abb. 26B). Das Zellzentrifugat wurde in denaturierendem Lyse-Puffer resuspendiert und enthält die unlöslichen Proteine (Bahn 4; Abb. 26B). Wie man auf dem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel sehen kann, ist His₆-MXAN0207 mit einer molekularen Masse von 16 kDa zu sehen. Man kann außerdem deutlich erkennen, dass das Protein His₆-MXAN0207 größtenteils löslich ist. Aus diesem Grund wurde die lösliche Fraktion mit His₆-MXAN0207 über eine Säule mit Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt.

Dazu wurde das His₆-MXAN0207 wie in 3.6.2 beschrieben an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden und der gesamte Ansatz auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde gewaschen (Bahn 5; Abb. 26B), und durch verschiedene Konzentrationen von Imidazol im Elutionspuffer (Bahnen 6-11; Abb. 26B) wurde His₆-MXAN0207 von der Ni²⁺-NTA-Agarose verdrängt und somit eluiert. Wie man auf dem SDS-Polyacrylamidgel erkennen kann, wird mit einer Konzentration von 250 mM Imidazol die größte Menge von MXAN0207 von der Säule eluiert. In dieser Fraktion sind auch keine Verunreinigungen anderer Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen, so dass das Protein MXAN0207 zu Eurogentec (Seraing, Belgien) gesandt werden konnte, um damit eine Immunisierung eines Kaninchen durchzuführen und polyklonale Antikörper herzustellen.

4.3.3 Western Blot Analysen mit α -MXAN0207

Das entstandene MXAN0207 Antiserum wurde mittels Western Blot Analyse überprüft. Als Probe wurde aufgereinigtes MXAN0207 verwendet, um die Spezifität des Antiserums zu testen. Von dem aufgereinigten MXAN0207 wurden 0,2 μ g auf ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli aufgetragen und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde das Antiserum von α -MXAN0207 und das Präimmunserum als Negativkontrolle verwendet. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, erkennt der Antikörper α -MXAN0207 das aufgereinigte Protein, während mit dem Präimmunserum nichts detektiert wird. Das Protein hat die korrekte molekulare Masse von 16 kDa. Somit ist der Antikörper α -MXAN0207 spezifisch. Diese Western Blot Analyse müsste mit Zellen von Wildtyp und MXAN0207-Mutante, die momentan noch nicht existiert, wiederholt werden.

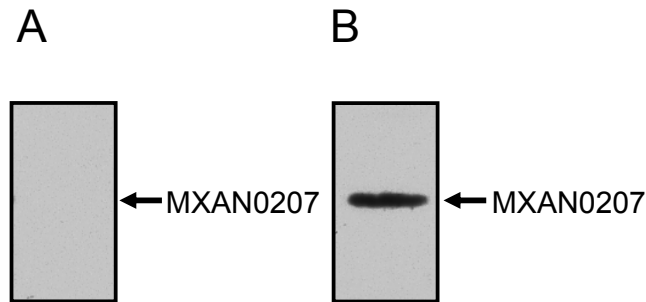


Abbildung 27: Überprüfung des MXAN0207 Antiserums. 0,2 µg aufgereinigtes MXAN0207 wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach Lämmli aufgetrennt. **(A)** Die Detektion von MXAN0207 fand, als Negativkontrolle, mit dem Präimmunserum statt. **(B)** Die Detektion von MXAN0207 fand mit dem α-MXAN0207 Antiserum statt.

4.4 „Yeast-Two-Hybrid“ Analysen

Das „Yeast-Two-Hybrid“ (Y2H)-System wurde für Interaktionsanalysen zwischen den folgenden Proteinen bzw. Domänen verwendet: p25, p17, MXAN0206, Peptidase-Domäne von MXAN0206, N-terminale Verlängerung von MXAN0206 und MXAN0207. Im Folgenden sprechen wir zur Vereinfachung von der Peptidase-Domäne von MXAN0206 als Peptidase und von der N-terminalen Verlängerung von MXAN0206 als N-terminale Verlängerung.

Voraussetzung für das Y2H-System ist die Aktivierung von stromabwärts liegenden Reportergen durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors (Gal4) an die stromaufwärts lokalisierte Aktivierungsdomäne. Im Y2H System wurde dieser Transkriptionsfaktor in eine Binde- und eine Aktivierungsdomäne aufgeteilt. Die beiden Domänen verhalten sich wie das intakte Protein, wenn sie in enge räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Findet eine Interaktion der an die beiden Domänen fusionierten Proteine statt, erfolgt die Transkription der Reportergene (Abb. 28). Die Reportergene im AH109-Stamm aus *S. cerevisiae* kodieren für die *de-novo*-Synthese von Adenin (Ade), Histidin (his) und α,β-Galaktosidase. Die Plasmide selbst besitzen jeweils ein Markergen für die Selektion in Hefe: pGADT7 besitzt das Markergen LEU1 und pGBKT7 das Markergen TRP1. Einer Hefezelle, die beide Plasmide enthält, ist es möglich, Tryptophan (Trp) und Leucin (leu) selbst zu synthetisieren und daher auf Medium ohne Trp und Leu zu wachsen. Bei Interaktionen findet auf -Leu/-Trp Medium eine weiße Färbung der Zellen statt. Dies reicht allerdings nicht für eine

genaue Beurteilung der Interaktion. Beobachtet man zudem Wachstum auf Medium ohne Leu/His/Ade/Trp und eine blaue Färbung aufgrund der α -Galaktosidase Aktivität, kann man von einer echten Interaktion ausgehen.

Die in 3.5.1 aufgelisteten Plasmide wurden nun für Interaktionsanalysen in Hefe transformiert. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide pGADT7-T und pBKT7-53 in Hefe transformiert. Der Vektor pGADT7-T kodiert für ein T-Antigen. pBKT7-53 kodiert für eine Fusion der GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) und dem p53-Gen aus *Mus musculus*. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine starke Interaktion zeigen. Als Negativkontrolle fungierte pGBKT7-*lam* und pGADT7-T. pGBKT7-*lam* stellt eine Fusion der DNA-BD mit menschlichem Lamin C dar und ist dafür bekannt mit, nur wenigen Proteinen zu interagieren (Bartel et al., 1993).

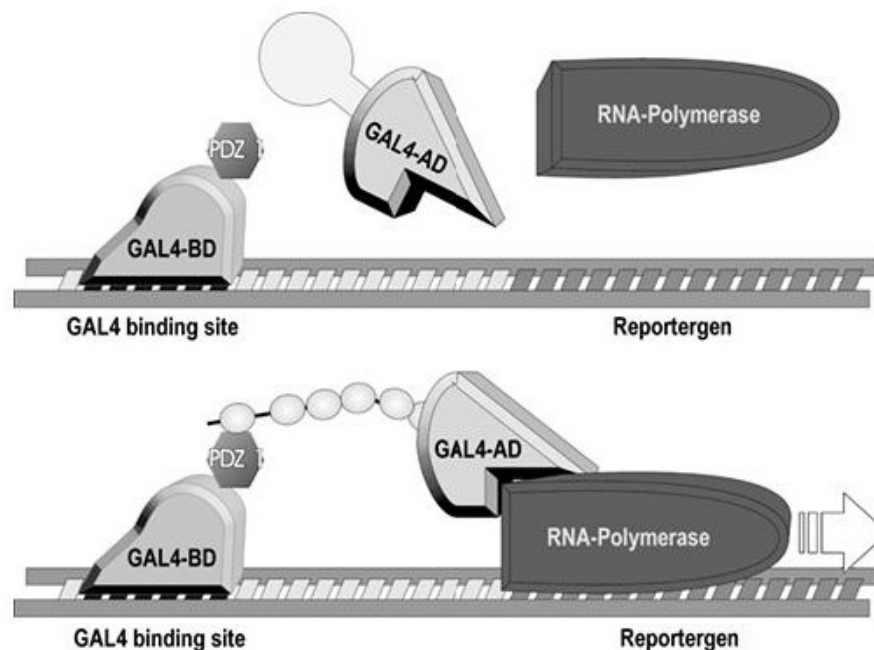


Abbildung 28: Schema des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems. Das Bait-Fusionsprotein bindet an die GAL4-Bindestelle vor einem Reporter gen im Genom einer Hefezelle. Ein Prey-Fusionsprotein muss nun in der Lage sein, an dieses Bait-Fusionsprotein zu binden. Nur wenn eine solche Interaktion stattfindet (s. unten), resultiert daraus eine funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors, was eine Expression des Reportergens zur Folge hat. Über dieses kann die Interaktion detektiert werden. Als Reportergene dienen ADE1 und HIS, die die *de-novo*-Synthese von Adenin und Histidin ermöglichen, sowie α - und β -Galaktosidase. Die Abkürzung GAL4-AD steht für Aktivierungsdomäne und GAL4-BD für die DNA-Bindedomäne (Bildquelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Y2H.jpg>).

Bei der Y2H-Analyse ist es notwendig, die jeweiligen Vektoren zunächst dem leeren Gegenvektoren zu transformieren, um eine Aktivierung der Reportergene durch Fusionsproteine ausschließen zu können (Transaktivierung).

Aus dem Test in Abbildung 29 ist erkennbar, dass keine Transaktivierung erfolgt. Es ist nur zu beobachten, dass die Färbung der Kolonien auf -Leu/-Trp Medium Schwankungen unterliegt. Wenn man dann aber das Medium ohne Leu/Trp/His/Ade untersucht, erkennt man, dass dort kein Wachstum zu beobachten ist. Das ist das stringenteste Medium und daher sehr aussagekräftig (Bartel et al., 1993).

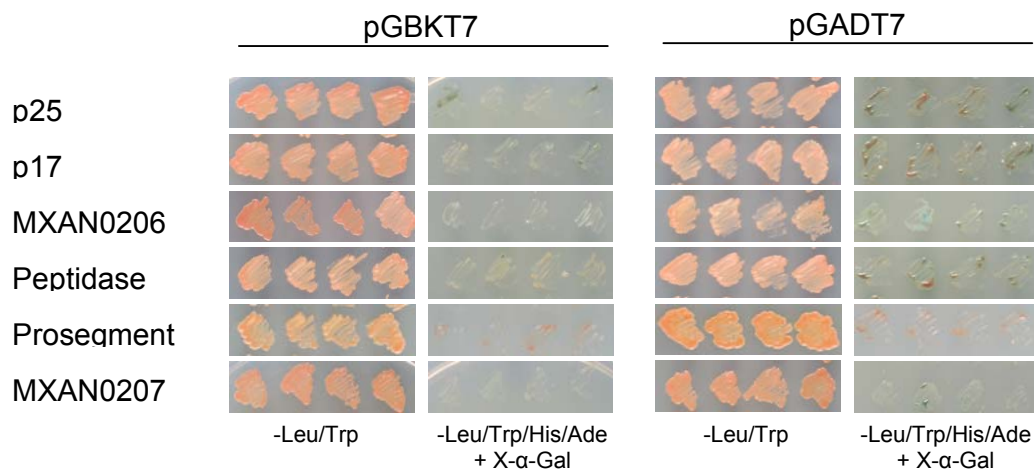


Abbildung 29: Test der Plasmide auf Transaktivierung durch die Reportergene. Wachstum von Kolonien, die mit dem jeweiligen Plasmid und dem leeren Gegenplasmid transformiert wurden.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“-Analyse. Zum Vergleich sind oben die Positivkontrolle und die Negativkontrolle aufgeführt. Tabelle 26 zeigt eine Zusammenfassung der Protein-Interaktionen. Wie man dieser Tabelle entnehmen kann, findet eine sehr starke Interaktion zwischen p25 und p17 in beiden Vektorkombinationen statt. Zudem interagieren p25 und p17 auch sehr stark mit sich selbst. Schaut man in Abbildung 30, lässt sich dies gut nachvollziehen. Die erwähnten Stämme bilden auf -Leu/-Trp Medium hellrote Kolonien. Auf dem -Leu/-Trp/-His/-Ade+X-α-Gal Medium ist bei diesen Stämmen starkes Wachstum und eine leichte Blaufärbung der Kolonien erkennbar. Ebenfalls lassen sich sehr starke Interaktionen zwischen der N-

terminalen Verlängerung von MXAN0206 und p17, MXAN0207 und p17, sowie MXAN0206 und MXAN0207 erkennen. Allerdings sind diese Interaktionen nur in einer Vektorkombination zu beobachten. Leichte Interaktionen erfolgen zwischen der Peptidase-Domäne von MXAN0206 und p17, sowie zwischen der Peptidase-Domäne von MXAN0206 und MXAN0207 in beiden Vektorkombinationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Wachstum und die Blaufärbung der Kolonien auf -Leu/-Trp/-His/-Ade+X- α -Gal Medium längst nicht so ausgeprägt ist, wie bei den Stämmen, die starke Interaktion zeigen. Alle weiteren Kombinationen zeigen keine Interaktion über das Y2H-System.

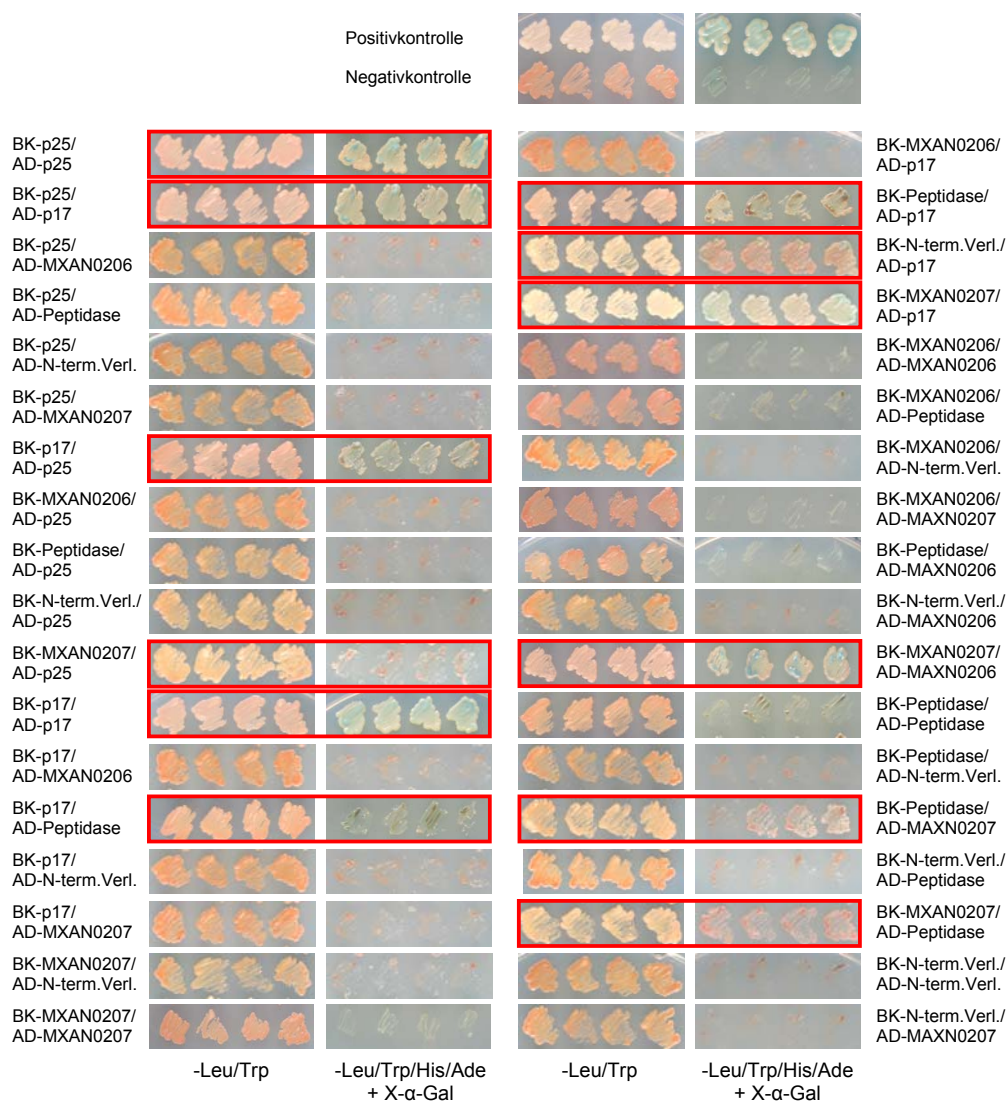


Abbildung 30: Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“ Analyse. Es ist jeweils das Wachstumsverhalten von vier Klonen auf -Leu/-Trp Medium und -Leu/-Trp/-His/-Ade+X- α -Gal Medium gezeigt. Die Interaktionen von Proteinen sind mit einem roten Kästchen gekennzeichnet.

pGADT7 pBKT7	p25	p17	MXAN0206	Peptidase- Domäne	N-terminale Verlängerung	MXAN0207
p25	++	++	-	-	-	-
p17	++	++	-	+	-	-
MXAN0206	-	-	-	-	-	-
Peptidase- Domäne	-	+	-	-	-	+
N-terminale Verlängerung	-	++	-	-	-	-
MXAN0207	-	++	++	+	-	-

Tabelle 26: Zusammenfassung der Protein-Interaktionen. Keine Interaktionen sind durch ein (-), leichte Interaktion ist durch ein (+) und starke Interaktion ist durch ein (++) markiert.

4.5 Proteinkonstrukte für Interaktionsstudien

Mit dem „Yeast-Two-Hybrid“-System wurden Interaktionen von unterschiedlichen Proteinen bzw. Protein-Domänen gefunden. Um diese Ergebnisse verifizieren zu können, ist es notwendig, sie durch eine zweite unabhängige Methode zu bestätigen. In unserem Fall sollte Koimmunopräzipitation verwendet werden. Dazu war es nötig, die Peptidase-Domäne, sowie die N-terminale Verlängerung von MXAN0206 zu überexprimieren und aufzureinigen. Leider blieb keine Zeit, die aufgereinigten Domänen in Koimmunopräzipitationen zu verwenden.

4.5.1 Überproduktion und Aufreinigung der Peptidase-Domäne von MXAN0206

Um die Peptidase-Domäne von MXAN0206 in einer Koimmunopräzipitation verwenden zu können, war es nötig, die Domäne heterolog in *E. coli* zu produzieren und aufzureinigen. Das in 3.5.2 beschriebene Plasmid pAB-32 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) transformiert.

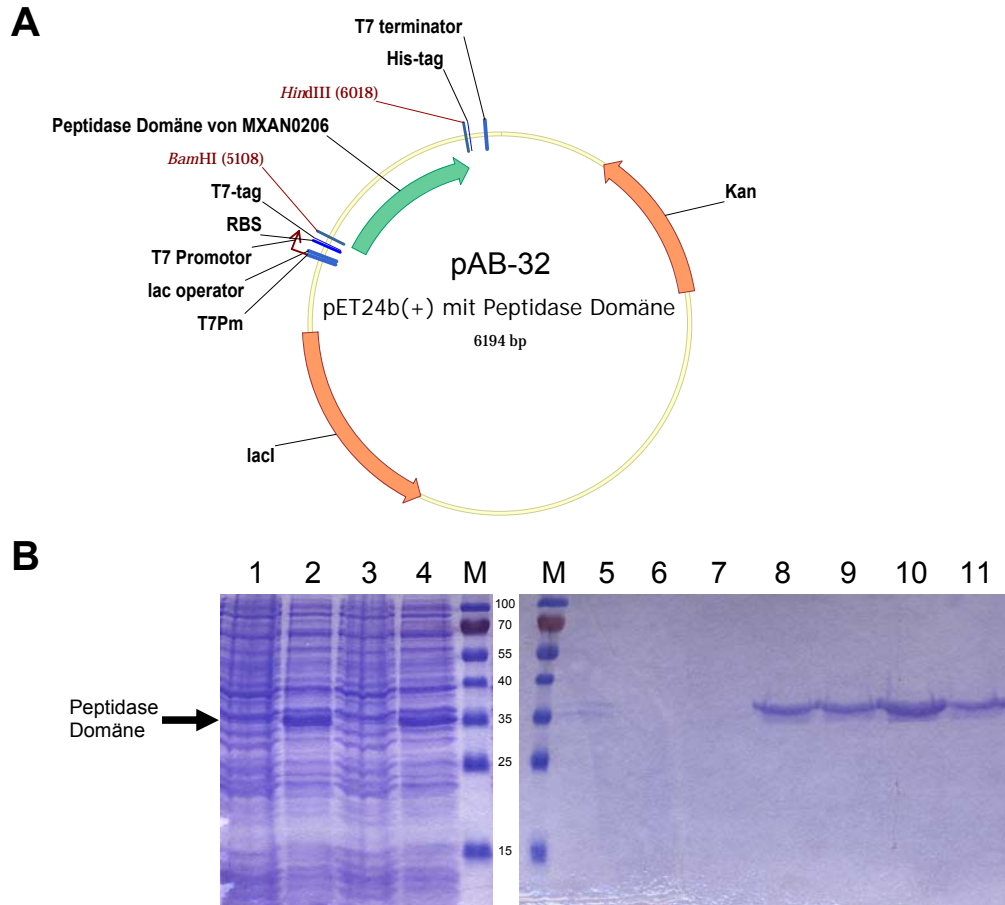


Abbildung 31: Überproduktion und Aufreinigung von His₆-Peptidase-Domäne. (A) Dargestellt ist das Plasmid pAB-32, bestehend aus dem Vektor pET-24b(+) mit der Peptidase Domäne von 523-1410 bp des Gens *MXAN0206*. Das Plasmid kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. (B) Es ist ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Als Molekularmassenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot). 1: nicht induzierte Kontrolle (t_0); 2: IPTG-induzierte Kultur; 3: lösliche Fraktion nach Aufnahme in nativem Lyse-Puffer; 4: unlösliche Fraktion nach Aufnahme in denaturierendem Lyse-Puffer. Diese Fraktion wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Das Resultat ist in den folgenden Bahnen zu sehen. 5: Durchfluss des Waschschritts; 6: Elution mit 50 mM Imidazol; 7: Elution mit 100 mM Imidazol; 8: Elution mit 150 mM Imidazol; 9: Elution mit 200 mM Imidazol; 10: Elution mit 250 mM Imidazol; 11: Elution mit 500 mM Imidazol.

Für die Überexpression wurde eine Kultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,8 kultiviert und eine Probe entnommen (nicht induzierte Probe; Abb. 31B, Bahn 1). Dann wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und für 20 Stunden auf 18°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe entnommen (IPTG-induzierte Probe; Abb.31B, Bahn 2) und die Kultur abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in nativem Lyse-Puffer aufgenommen, mittels Ultraschall aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der entstandene

Überstand enthält die löslichen Proteine (Bahn 3, Abb. 31B). Das Zellzentrifugat wurde in denaturierendem Lyse-Puffer resuspendiert und enthält die unlöslichen Proteine (Bahn 4; Abb. 31B). Wie man auf dem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel erkennen kann, wird die His₆-Peptidase-Domäne mit einer molekularen Masse von 32 kDa detektiert. Man kann außerdem deutlich erkennen, dass die His₆-Peptidase-Domäne nicht löslich ist und sich in Einschlusskörpern befindet. Diese Einschlusskörper wurden in denaturierendem Lyse-Puffer mit 8M Harnstoff gelöst und über eine Säule mit Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt.

Dazu wurde die His₆-Peptidase-Domäne wie in 3.6.2 beschrieben an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden und der gesamte Ansatz auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde gewaschen (Bahn 5; Abb. 31B) und durch verschiedene Konzentrationen von Imidazol im Elutionspuffer (Bahnen 6-11; Abb. 31B) wurde die His₆-Peptidase Domäne von der Ni²⁺-NTA-Agarose verdrängt und von der Säule eluiert. Wie man auf dem SDS-Polyacrylamidgel erkennen kann, wird mit einer Konzentration von 250 mM Imidazol die größte Menge der Peptidase Domäne von der Säule eluiert. In dieser Fraktion sind auch keine Verunreinigungen anderer Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen.

4.5.2 Überproduktion und Aufreinigung der N-terminalen Verlängerung von MXAN0206

Um die N-terminale Verlängerung von MXAN0206 in einer Koimmunopräzipitation verwenden zu können, war es nötig, die Verlängerung heterolog in *E. coli* zu produzieren und aufzureinigen. Das in 3.5.2 beschriebene Plasmid pAB-34 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) transformiert.

Für die Überexpression wurde eine Kultur in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,8 kultiviert und eine Probe entnommen (nicht induzierte Probe; Abb. 32B, Bahn 1). Dann wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und für 20 Stunden auf 18°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe entnommen (IPTG-induzierte Probe; Abb.32B, Bahn 2) und die Kultur

abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in nativem Lyse-Puffer aufgenommen, mittels Ultraschall aufgeschlossen und erneut zentrifugiert.

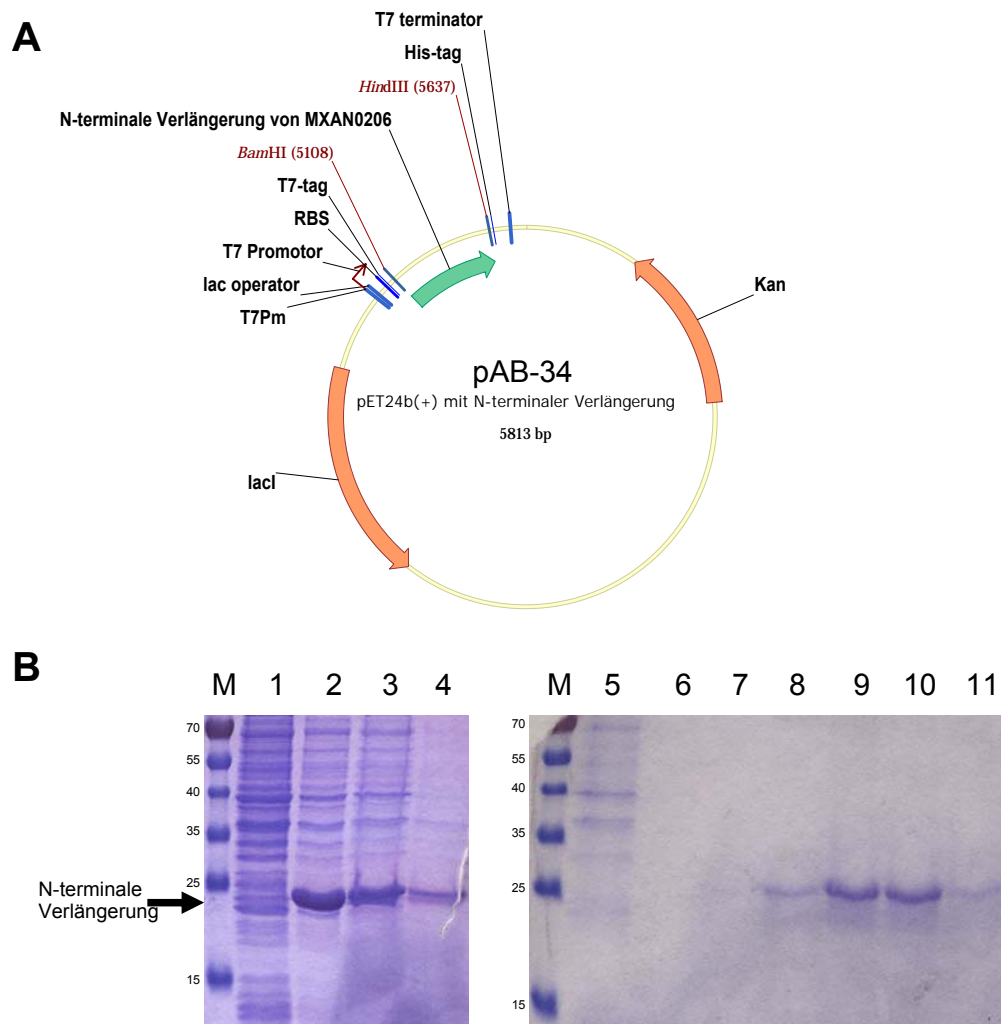


Abbildung 32: Überproduktion und Aufreinigung von His₆-N-terminale Verlängerung. (A) Dargestellt ist das Plasmid pAB-34, bestehend aus dem Vektor pET-24b(+) mit der N-terminalen Verlängerung von 1-522 bp des Gens *MXAN0206*. Das Plasmid besitzt eine Kanamycin-Resistenz. **(B)** Es ist ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Als Molekularmassenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot). 1: nicht induzierte Kontrolle (t_0); 2: IPTG-induzierte Kultur; 3: lösliche Fraktion nach Aufnahme in nativem Lyse-Puffer; 4: unlösliche Fraktion nach Aufnahme in denaturierendem Lyse-Puffer. Die lösliche Fraktion wurde unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Das Resultat ist in den folgenden Bahnen zu sehen. 5: Durchfluss des Waschschritts; 6: Elution mit 50 mM Imidazol; 7: Elution mit 100 mM Imidazol; 8: Elution mit 150 mM Imidazol; 9: Elution mit 200 mM Imidazol; 10: Elution mit 250 mM Imidazol; 11: Elution mit 500 mM Imidazol.

Der entstandene Überstand enthält die löslichen Proteine (Bahn 3, Abb. 32B). Das Zellzentrifugat wurde in denaturierendem Lyse-Puffer resuspendiert und enthält die unlöslichen Proteine (Bahn 4; Abb. 32B). Wie man auf dem 16%igen

SDS-Polyacrylamidgel sehen kann, wird His₆-N-terminale Verlängerung mit einer molekularen Masse von 19 kDa detektiert. Man kann außerdem deutlich erkennen, dass die His₆-N-terminale Verlängerung größtenteils löslich ist. Deshalb wurde zur Aufreinigung die Fraktion mit den löslichen Proteinen über eine Säule mit Ni²⁺-NTA-Agarose gegeben.

Dazu wurde die His₆-N-terminale Verlängerung wie in 3.6.2 beschrieben an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden und der gesamte Ansatz auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde gewaschen (Bahn 5; Abb. 32B) und durch verschiedene Konzentrationen von Imidazol im Elutionspuffer (Bahnen 6-11; Abb. 32B) wurde die His₆-N-terminale Verlängerung von der Ni²⁺-NTA-Agarose verdrängt und von der Säule eluiert. Wie man auf dem SDS-Polyacrylamidgel erkennen kann, werden mit Konzentrationen von 200 bis 250 mM Imidazol die größten Mengen der N-terminalen Verlängerung von der Säule eluiert. In dieser Fraktion sind auch keine Verunreinigungen anderer Proteine auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen.

5 Diskussion

Interzelluläre Signale erlauben Bakterien die zelluläre Aktivität als Antwort auf die Zelldichte oder Zellposition zu kontrollieren (Bassler & Losick, 2006). In Systemen, die für die Wahrnehmung der Zelldichte verantwortlich sind, sind die Signale kleine, diffusionsfähige Moleküle und die Signal-Weiterleitung ist nicht von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig. Gegensätzlich dazu findet man in Systemen, die der Wahrnehmung der Zellposition dienen, Signale, die mit der Zelloberfläche assoziiert sind und wo die Signal-Übertragung von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig ist (Bassler & Losick, 2006).

Kontakt-abhängige Signal-Weiterleitung ist unerlässlich bei der durch Hunger induzierten Bildung von Fruchtkörpern, bei der zwei morphologische Ereignisse auftreten: die Aggregation von Zellen zu Fruchtkörpern und die Sporulation der Zellen innerhalb der Fruchtkörper. Diese beiden Ereignisse werden induziert und koordiniert von p17, dem 17 kDa C-Signal-Protein (Kim & Kaiser, 1991; Kruse et al., 2001; Li et al., 1992). Die C-Signal-Weiterleitung erfolgt durch einen kontakt-abhängigen Mechanismus (Kim & Kaiser, 1990; Kim & Kaiser, 1990) und zwei morphogenetische Antworten, die die Zellposition wiedergeben, werden ab einem bestimmten Schwellenwert induziert (Kim & Kaiser, 1991; Kruse, et al., 2001; Li, et al., 1992). p17 entsteht durch die proteolytische Spaltung eines 25 kDa Vorläufer-Proteins (p25), welches von dem *csgA* Gen kodiert wird. Bei dieser proteolytischen Spaltung wird der N-Terminus von 8 kDa von p25 entfernt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). p25 akkumuliert sowohl in vegetativen als auch in sich entwickelnden Zellen, aber p17 ist nur während der Entwicklung zu detektieren (Kruse, et al., 2001). Um erklären zu können, warum p17 nur in hungernden Zellen vorkommt, war das Ziel dieser Arbeit, die Protease zu finden, die für diese Spaltung von p25 zu p17 verantwortlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass *M. xanthus* Zellextrakt gereinigtes p25 *in vitro* spalten kann, und dass diese *in vitro* Spaltung mit dem Serin Protease Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gehemmt wird (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Zudem sind p25 und p17 in der äußeren Membran lokalisiert (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Dies lässt vermuten, dass

die in diesem Prozess involvierte Protease wahrscheinlich sekretiert wird. Bei einer Analyse des *M. xanthus* Genoms (Goldman et al., 2006) wurden 146 Protease Gene gefunden, von denen 32 Gene für Serin Proteasen kodieren, welche wahrscheinlich sekretiert werden (siehe 4.1). Basierend auf der erwarteten subzellulären Lokalisation und auf der erwarteten Inhibition durch PMSF konnte die Anzahl auf 20 Gene, kodierend für 10 Trypsin-ähnliche und 10 Subtilisin-ähnliche Serin Proteasen, eingeschränkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Protease-Aktivität in vegetativen Zellen vorhanden ist, aber während der Entwicklung die Protease-Aktivität ansteigt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Deshalb haben wir angenommen, dass die Transkription des Protease-Gens während der Entwicklung hoch reguliert sein muss. Durch die Daten von DNA-Microarrays und von quantitativer real-time PCR konnte dargelegt werden, dass acht der 20 Gene während der Entwicklung auf Transkriptionsebene signifikant reguliert werden. Bei drei Genen geht die Regulation nach unten. Fünf Gene werden während der Entwicklung hoch reguliert und stellen somit die besten potentiellen Kandidaten für das für die Serin-Protease PopC kodierende Gen dar. Dennoch werden von allen regulierten Genen Insertionsmutanten hergestellt.

Von diesen acht Insertionsmutanten zeigt die Mutante mit der Insertion in *MXAN0206* als Einzige einen Defekt in der Entwicklung. Nach 120 Stunden Nährstoffmangel kann man nur leichte Aggregation, aber keine Fruchtkörper erkennen (Abb. 9). Weiterhin war die Sporulation auf das Level einer *csgA*-Mutante reduziert (<0,1% des Wildtyps DK1622). *MXAN0206* ist Teil eines Operons, welches aus zwei Genen besteht, und wird mit dem Gen *MXAN0207* ko-transkribiert (siehe 4.2.1). Deshalb war es wichtig eine genetische Komplementation durchzuführen (siehe 4.2.2). Damit konnte gezeigt werden, dass der Defekt in der Entwicklung nicht auf einen polaren Effekt des stromabwärts liegenden Gens *MXAN0207* zurückzuführen ist, sondern von der Insertion in *MXAN0206* verursacht wird. Zusätzlich konnte mit einer Bewegungsanalyse gezeigt werden, dass die *MXAN0206*-Mutante ein normales Bewegungsverhalten aufweist. Der Defekt in der Entwicklung ist somit nicht durch einen Defekt im Bewegungsverhalten bedingt.

Ein wesentliches Ergebnis stellt auch die Akkumulation von p17 dar. In der *MXAN0206*-Mutante (SA2314) akkumuliert p25 in vegetativen und hungernden Zellen (siehe 4.2.5). Allerdings konnte p17 nicht nachgewiesen werden. Daraus kann man folgern, dass *MXAN0206* an der Spaltung von p25 zu p17 beteiligt ist. Allerdings lässt sich mit diesem Experiment nicht feststellen, ob die Spaltung direkt oder indirekt erfolgt.

Die Akkumulation von *MXAN0206* in Wildtyp-Gesamtzellextrakt nimmt während der Entwicklung ab, was bedeutet, dass *MXAN0206* während der Entwicklung entweder sekretiert oder abgebaut wird. Um dies zu untersuchen, wurde zell-freier Überstand von vegetativen und sich entwickelnden Wildtyp- und *MXAN0206*-Mutanten-Zellen (siehe 4.2.8) isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass *MXAN0206* nur im Überstand von sich entwickelnden Wildtyp-Zellen detektiert werden kann und demnach *MXAN0206* während der Entwicklung sekretiert wird. Betrachtet man den Überstand über einen Zeitraum von 24 Stunden, so sieht man, dass synchron zur Abnahme von *MXAN0206* im Wildtyp-Zellextrakt die Menge an sekretiertem *MXAN0206* ansteigt. Daher kann man argumentieren, dass in dem Zeitraum von 9 bis 18 Stunden, indem die p17 Akkumulation gipfelt, auch ein Anstieg der Menge an sekretiertem *MXAN0206* zu verzeichnen ist. Allerdings konnte *MXAN0206* im Überstand nicht nachgewiesen werden, wenn keine Protease-Inhibitoren zu gesetzt wurden. Dies deutet daraufhin, dass *MXAN0206* sehr instabil ist. Bei einer Zellfraktionierung konnte *MXAN0206* nur in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden, in der sich die zytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Proteine befinden. All diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *MXAN0206* ein lösliches Protein ist, welches nur in hungernden Zellen im vollen Umfang sekretiert wird.

Um genetisch zu zeigen, dass die Protease Aktivität für die p25 Prozessierung wichtig ist, wurde das Ser423 der katalytischen Triade durch ein Alanin ersetzt. Wie in 4.2.4 beschrieben, kann das *MXAN0206*^{S423A}-Allel den Entwicklungsdefekt der *MXAN0206*-Mutante nicht komplementieren (Abb.17). Zudem sieht man keine Akkumulation von p17 in SA2329 (*MXAN0206*^{S423A}-Mutante) (Abb.18) und Western Blot Analysen mit dem α-*MXAN0206*-Antikörper zeigen, dass *MXAN0206*^{S423A} in gleichen Mengen akkumuliert wie *MXAN0206*

im Wildtyp (Abb. 20). All diese Daten weisen daraufhin, dass MXAN0206 eine Subtilisin-ähnliche Protease ist, die an der proteolytische Prozessierung von p25 beteiligt ist.

Um eine direkte oder indirekte Spaltung von p25 durch MXAN0206 zeigen zu können, wurden die Fusionsproteine His₆-MXAN0206 und His₆-MXAN0206^{S423A} aufgereinigt und in einem *in vitro* Protease-Assay verwendet. In dem Ansatz mit His₆-MXAN0206 und MalE-p25 konnte p17 detektiert werden, während man in dem Ansatz mit His₆-MXAN0206^{S423A} und MalE-p25 p17 nicht nachweisen konnte. Durch diesen Versuch konnte dargelegt werden, dass MXAN0206 p25 direkt spaltet.

Der Entwicklungsphänotyp von der *MXAN0206*-Mutante ist nicht mit dem der *csgA*-Mutante identisch (Abb. 9). Der Entwicklungsdefekt der *csgA*-Mutante kann mit der Ko-Entwicklung von Wildtyp-Zellen ausgeglichen werden (Hagen et al., 1978). In diesem Versuch stellen die Wildtyp-Zellen den *csgA*-Zellen das fehlende p17 bereit. Wenn MXAN0206 nur in der Synthese von p17 involviert ist, sollte der Entwicklungsdefekt der *MXAN0206*-Mutante durch Zugabe von Wildtyp-Zellen komplementiert werden können. Dass dies nicht möglich ist, konnte in 4.2.10 gezeigt werden. Wie bereits oben erwähnt, ist MXAN0206 sehr instabil und wird schnell abgebaut, wenn keine Protease-Inhibitoren gegenwärtig sind. Deshalb ist es zum einen vorstellbar, dass MXAN0206 aufgrund seiner Instabilität nur das p25 spalten kann, welches mit der äußeren Membran der Zelle assoziiert ist, die MXAN0206 sekretiert. Zum anderen kann man vermuten, dass MXAN0206 nicht nur an der Prozessierung von p25 beteiligt ist. Zudem kann es in der Prozessierung anderer Proteine involviert sein, die für die Entwicklung von *M. xanthus* wichtig sind und unabhängige Defekte zeigen. Somit können die unterschiedlichen Phänotypen von der *csgA*-Mutante und *MXAN0206*-Mutante daher rühren, dass MXAN0206 noch andere Zielproteine außer p25 hat.

5.1 MXAN0206 ist PopC

All die oben diskutierten Ergebnisse deuten in die Richtung, dass es sich bei MXAN0206 um die gesuchte sekretierte Serin-Protease PopC handelt. Aus diesem Grund wird von nun an MXAN0206 als PopC bezeichnet.

In Eukaryoten werden viele Pro-Hormone durch die Spaltung von speziellen Pro-Protein-Convertasen (PPC) aktiviert. Beispiele dafür sind Kex2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und Furin aus Säugern, welche beide Subtilisin-ähnliche Proteasen sind und in Sekretionswege eingreifen (Siezen & Leunissen, 1997). Unser Nachweis, dass PopC p25 spezifisch zu p17 spaltet, zeigt, dass bestimmte Subtilisin-ähnliche Proteasen, die ein aktives Signal Molekül generieren, nicht auf eukaryotische Zellen begrenzt sind, sondern auch in Bakterien vorkommen. Ein weiteres Beispiel stellt CSF, ein extrazelluläres Signal Molekül, aus *Bacillus subtilis* dar (Lanigan-Gerdes et al., 2007). Das Vorläufer-Protein pro-CSF wird durch die Subtilisin-Proteasen Epr, Vpr und Subtilisin zu CSF gespalten und damit aktiviert.

PopC ist allerdings aufgrund seiner Primärstruktur und Domänen-Organisation kein Mitglied der speziellen Unterfamilie von Subtilisin-ähnlichen Proteasen, zu denen die PPCs gehören (Rawlings & Barrett, 1994; Rockwell & Thorner, 2004). Obgleich die p25 Prozessierung von PopC funktionell analog zur Pro-Hormon-Prozessierung in Eukaryoten ist, so gehört die darin involvierte Protease zu einer anderen Subtilisin Unterfamilie.

Die Mehrheit der Subtilisine wird als Prä-Proenzym mit einem N-terminalen Signal-Peptid gefolgt von einem Prosegment synthetisiert (Siezen & Leunissen, 1997). Das Prosegment ist allgemein nicht konserviert (Siezen & Leunissen, 1997), kann als intramolekulares Chaperon fungieren (Ohta et al., 1991) und durch Autoproteolyse entfernt werden (Ikemura & Inouye, 1988). Wir konnten nur das vollständige Protein PopC in *M. xanthus* nachweisen. Dies kann einerseits bedeuten, dass PopC keiner Autoproteolyse unterliegt und die N-terminale Verlängerung nicht abgespalten wird. Andererseits ist es möglich, dass, wenn PopC N-terminal modifiziert wird, die Lebenszeit des entstehenden Proteins zu kurz ist, um detektiert zu werden.

Betrachtet man noch einmal die Domänenstruktur von PopC (Abb. 11), so fällt auf, dass PopC kein Signalpeptid besitzt. Das Fehlen des Signalpeptids lässt vermuten, dass PopC entweder durch ein Typ-I-Sekretionssystem (Andersen et al., 2001) oder durch ein Typ-III-Sekretionssystem (Cornelis, 2006) aus der Zelle geschleust wird. Typ-I-Sekretionssysteme sind in vielen Bakterien beschrieben, unter anderem in *E. coli*. Ein Beispiel ist die Sekretion

von α -Hämolysin. Das α -Hämolysin wird über einen sogenannten ABC-Transporter unter ATP-Spaltung durch die beiden Membranen von *E. coli* geschleust (Balakrishnan et al., 2001). Auch die Typ-III-Sekretionssysteme sind in Bakterien häufig zu finden. Ein beschriebenes Typ-III-Sekretionssystem kommt in *Yersinia pseudotuberculosis* vor. Bei diesem Sekretionssystem werden die Yop-Proteine über einen Porenapparat, der sich über die beiden bakteriellen Membranen und schließlich über die Wirtsmembran erstreckt, in die Wirtszelle überführt (Bartra et al., 2001; Cheng & Schneewind, 2000; Smith et al., 2001). Das Sekretionssystem, welches in der PopC Sekretion involviert ist, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Aber bei einer Analyse des Genoms von *M. xanthus* wurden sowohl Typ-I-Sekretionssysteme als auch Typ-III-Sekretionssysteme gefunden.

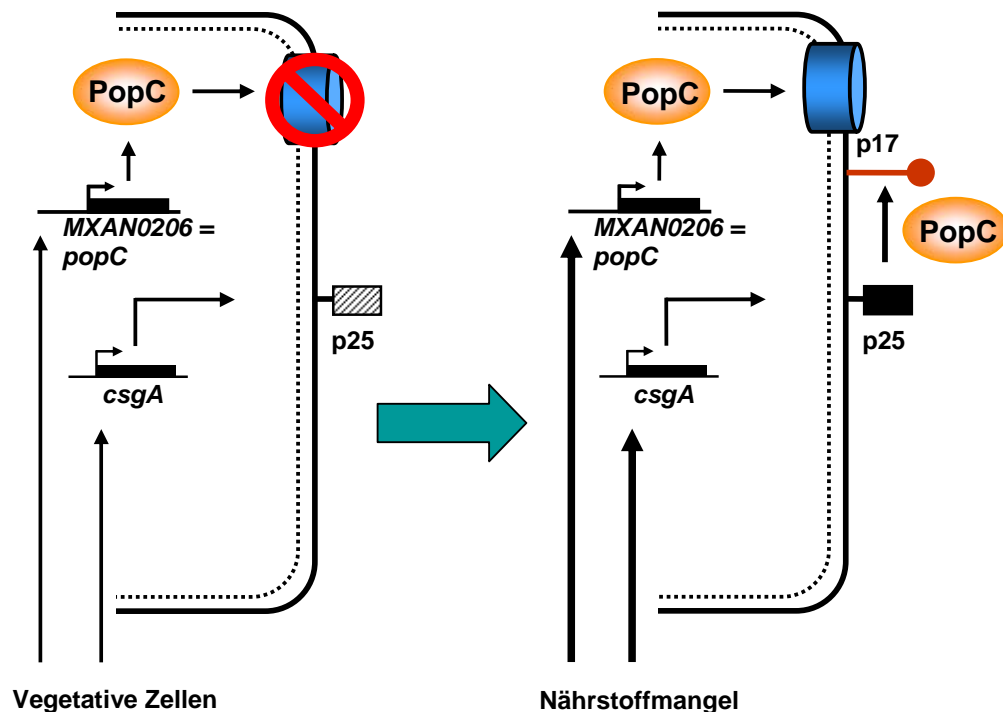


Abbildung 33: Allgemeines Modell zur Sekretion von PopC. In vegetativen Zellen wird *csgA* transkribiert, p25 exportiert und mit der Zelloberfläche assoziiert. Auch *popC* wird transkribiert, allerdings findet kein Export von PopC statt und es akkumuliert in der Zelle. Unter Nährstoffmangel wird PopC exportiert. PopC und p25 befinden sich im selben Kompartiment und die proteolytische Spaltung von p25 zu p17 erfolgt.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse zur Sekretion von PopC kann man zu dem folgenden Modell (Abb. 33) gelangen. In vegetativen Zellen wird

das *csgA*-Gen transkribiert und p25 wird durch einen noch nicht identifizierten Mechanismus exportiert. Außerhalb der Zelle wird p25, ebenfalls durch einen bislang noch unbekannten Mechanismus, mit der äußeren Membran assoziiert. Auch das *popC*-Gen wird in vegetativen Zellen transkribiert. Allerdings wird es nicht exportiert, sondern bleibt in der Zelle und akkumuliert. Wird die Zelle dann Nährstoffmangel ausgesetzt, führt dies dazu, dass PopC nicht länger in der Zelle verharret, sondern exportiert wird. Wie dies vor sich geht, ist bislang noch unbekannt. Durch diesen Export jedoch gelangt PopC in räumliche Nähe zu p25 und kann p25 proteolytisch zu p17 spalten. In diesem Fall würde man von regulierter Proteolyse sprechen, die auf einer Regulation der Sekretion von PopC basiert.

5.2 Regulierte Proteolyse

Proteolyse als ein Mittel zur Sicherung einer angemessenen Aktivierung bzw. Inaktivierung eines Proteins ist ein allgemein bekannter regulatorischer Mechanismus (Ehrmann & Clausen, 2004; Jenal & Hengge-Aronis, 2003). In allen Fällen ist ein bestimmter Faktor einer kontrollierten und regulierten Proteolyse ausgesetzt als Antwort auf ein intrazelluläres oder Umwelt-Signal.

Die Regulation der Proteolyse kann sowohl zeitlich oder räumlich sein, als auch durch ein Signal erfolgen. Bei dem zeitlich regulierten Mechanismus wird die Protease nur bei Bedarf synthetisiert. Ein Beispiel für diesen Mechanismus liefert *Caulobacter crescentus* mit der Protease PerP, die PodJ_L zu PodJ_S abbaut (Chen et al., 2006).

Ein Modell, welches die regulierte Proteolyse durch ein extrazelluläres Signal erklären kann, lässt sich in *E. coli* finden. Extrazytoplasmatischer Stress, ausgelöst durch Überexpression von äußeren Membranproteinen wie OmpX (Mecbas et al., 1993; Otto & Hermansson, 2004), führt zu einer Spaltung des Anti-Sigmafaktors RseA durch DegS. Dies wiederum sorgt für eine Freisetzung von σ^E im Zytoplasma und somit zur Aktivierung des σ^E -Regulons (Ades et al., 1999). Durch die Bindung der PDZ-Domäne von DegS an ein C-terminales Motiv äußerer Membranproteine wird die proteolytische Kaskade aktiviert (Walsh et al., 2003).

Bei dem räumlich regulierten Mechanismus sind Substrat und Protease von einander getrennt und werden nur zur proteolytische Spaltung räumlich zusammen gebracht. Ein Beispiel dafür finden wir wieder in *C. crescentus*. Dort wird das Protein CtrA Zell-Zyklus abhängig abgebaut, nachdem es zusammen mit einer ClpXP Protease und einem RcdA Adapter-Protein kolokalisiert wurde (McGrath et al., 2006).

Wir vermuten, dass es sich bei der p25-Prozessierung auch um einen räumlich regulierten Mechanismus handelt. Die rechtzeitige Spaltung von p25 zu p17 kann dadurch sichergestellt werden, dass PopC und p25 in vegetativen Zellen in unterschiedlichen Zell-Kompartimenten gehalten werden. PopC ist es ausschließlich möglich während der Entwicklung zu sekretieren. Diese Kompartimentierung, welche durch die regulierte Proteolyse sichergestellt wird, führt zu einer Regulation der Sekretion von PopC. Nach unserem Wissen stellt das PopC/p25-System das erste bakterielle Beispiel dar, in dem die Regulation der Proteolyse auf einer Regulation der Sekretion basiert.

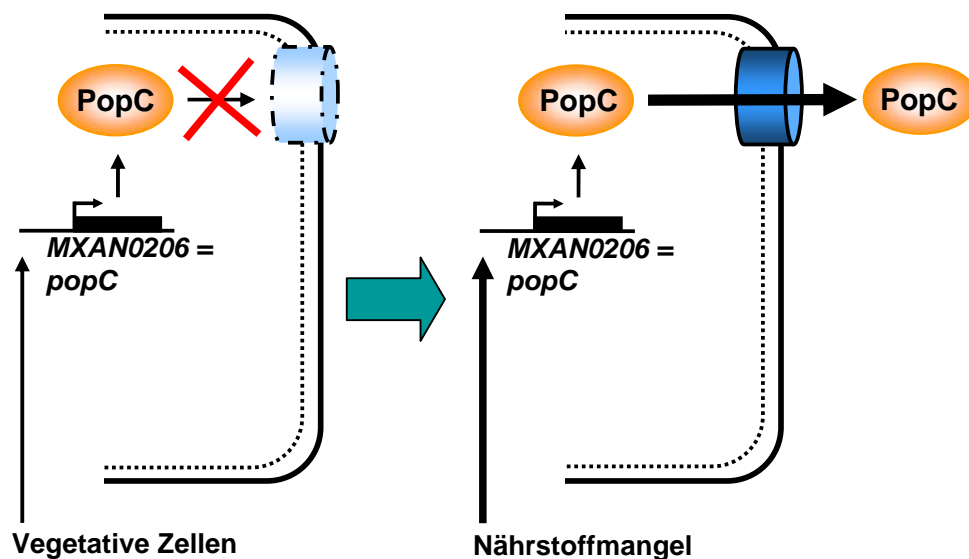


Abbildung 34: Modell zur regulierten Sekretion von PopC in Abhängigkeit der Synthese eines Sekretionssystem. In vegetativen Zellen akkumuliert PopC in der Zelle, da das Sekretionssystem nicht vorhanden ist. Während der Entwicklung wird die Synthese des Sekretionssystems induziert und PopC kann exportiert werden.

Wenn es sich bei der regulierten Proteolyse um eine Regulation der Sekretion handelt, stellt sich die Frage, wie diese Regulation der Sekretion

aussehen könnte. Dazu sind mindestens zwei Regulationsmodelle der Sekretion denkbar.

Das erste Modell ist in Abbildung 34 zu sehen. Hierbei handelt es sich um ein Modell zur regulierten Sekretion von PopC in Abhängigkeit der Synthese eines Sekretionssystem. In vegetativen Zellen wird das *popC*-Gen transkribiert. PopC akkumuliert in der Zelle, da kein Sekretionssystem zum Export vorhanden ist. Die Situation ändert sich, sobald die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel in die Entwicklung gehen. Die Synthese des Sekretionssystem findet während der Entwicklung statt und somit kann PopC exportiert werden.

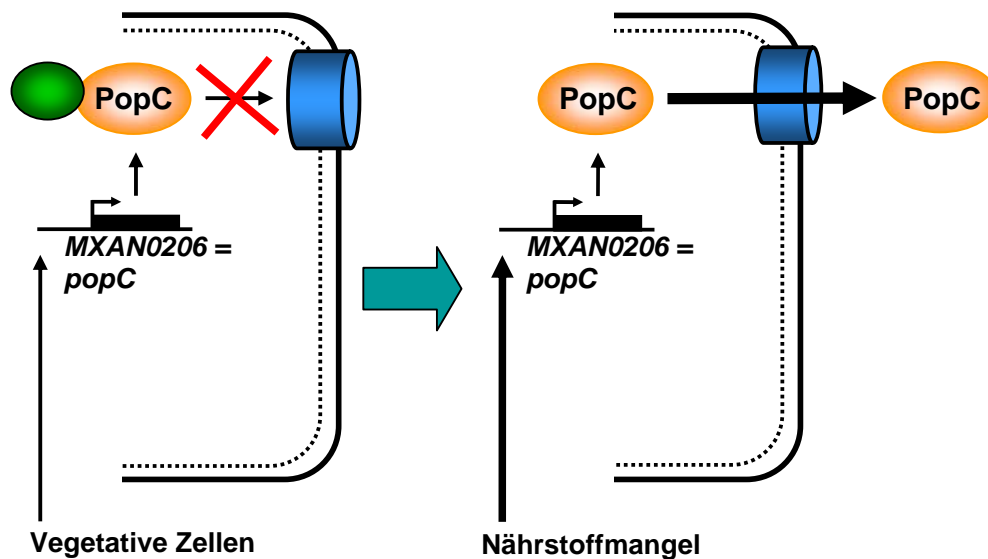


Abbildung 35: Modell zur regulierten Sekretion von PopC in Abhängigkeit eines Protein-Komplexes. In vegetativen Zellen akkumuliert PopC in der Zelle, allerdings nicht, weil das Sekretionssystem nicht vorhanden ist, sondern weil PopC in einem Proteinkomplex gehalten wird. Während der Entwicklung wird PopC aus dem Proteinkomplex entlassen und kann exportiert werden.

Das zweite Modell ist in Abbildung 35 zu sehen. Es handelt sich dabei um ein Modell zur regulierten Sekretion von PopC in Abhängigkeit eines Protein-Komplexes. In vegetativen Zellen akkumuliert PopC in der Zelle, weil es von einem anderen Protein in einem Proteinkomplex gehalten wird. Dabei kann man sich vorstellen, dass dieses Protein PopC durch die Komplex-Bildung inaktiv hält und am Export hindert. Wenn die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel in die Entwicklung gehen, löst sich der Proteinkomplex auf und

PopC kann exportiert werden. Interessanter Weise zeigen die Interaktionsstudien des „Yeast-Two-Hybrid“-System in 4.4 eine starke Interaktion von PopC und dem Protein MXAN0207. MXAN0207 könnte mit PopC den oben beschriebenen Protein-Komplex bilden. Dafür spricht auch, dass das Gen, welches für MXAN0207 kodiert, nachweislich mit dem *popC*-Gen eine Transkriptionseinheit bildet (siehe 4.2.1). „Yeast-Two-Hybrid“-Analysen haben gezeigt, dass MXAN0207 sehr stark mit p17 interagiert. Damit lässt sich die Möglichkeit nicht ausschließen, dass MXAN0207 mit PopC exportiert wird.

Beide Modelle beruhen auf Hypothesen und müssen bestätigt werden. Dazu ist eine genaue Untersuchung der Sekretionssysteme in *M. xanthus* notwendig. Man muss Mutanten der Sekretionssysteme herstellen und zeigen, ob die PopC Akkumulation bzw. Sekretion in diesen Mutanten verändert ist. Weiterhin muss auch das stromabwärts von *popC* gelegene *MXAN0207*-Gen näher untersucht werden. Vorläufige Daten lassen vermuten, dass *MXAN0207* essentiell ist, denn es war bis jetzt nicht möglich, eine *MXAN0207*-Mutante zu bekommen. Um dies zu zeigen, muss man eine zweite Kopie des Gens in den Wildtyp bringen und dann versuchen, dass *MXAN0207*-Gen am ursprünglich Genort auszuschalten. Weiterhin ist es wichtig, eine Doppelmutante *MXAN0206/MXAN0207* zu konstruieren. Mit dieser könnte man untersuchen, ob eine Deletion von *MXAN0207* nur in Anwesenheit von *MXAN0206* essentiell ist. Zudem müssen die Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“ Analysen verifiziert und durch unabhängige Methoden bestätigt werden. Zur Bestätigung einer Interaktion zwischen PopC und MXAN0207 könnte man eine Koimmunopräzipitation durchführen. Die Grundlagen für diesen Versuch konnten mit dieser Arbeit geschaffen werden, denn man kann beide Proteine nativ herstellen und gegen beide Proteine gibt es Antikörper. Der gleiche Versuchsansatz könnte auch zur Verifikation der Interaktion von p17 und MXAN0207 verwendet werden. Weiterhin wäre es interessant zu wissen, wo MXAN0207 in der Zelle lokalisiert ist.

Im Zusammenhang mit den beiden möglichen Modellen zur regulierten PopC-Sekretion möchte ich nun die Ergebnisse der Akkumulation von MXAN0206 *in vivo* in verschiedenen Entwicklungsmutanten diskutieren. In 4.2.7 konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von MXAN0206 in einer *csgA*-

Mutante nicht beeinflusst ist. Hingegen kann in den A-Signal-Mutanten *asgA* und *asgB* MXAN0206 nicht detektiert werden. Auch die Daten der DNA-Microarrays, die von vegetativen Zellen der *asgA*- bzw. *asgB*-Mutante stammen, zeigen eine starke Regulation von MXAN0206 nach unten (Weinhold & Wegener-Feldbrügge, 2007). Das heißt, MXAN0206 wird in diesen beiden Mutanten gar nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Somit bestätigen die Daten der DNA-Microarrays die Western Blot Analyse. Beide Experimente deuten darauf hin, dass die Expression von MXAN0206 abhängig von den Proteinen AsgA und AsgB ist. In der *fruA*-Mutante und in der *relA*-Mutante akkumuliert MXAN0206 gleichmäßiger als im Wildtyp, so dass selbst nach 24 Stunden in beiden Mutanten MXAN0206 detektiert werden kann. Bringt man diese Beobachtung mit den beiden hypothetischen Modellen für die regulierte Sekretion von PopC in Verbindung, so gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten der Interpretation.

Betreffend das Modell aus Abbildung 34, indem der Export von PopC in vegetativen Zellen aufgrund des Fehlens eines Sekretionssystems nicht stattfinden kann, könnte man vermuten, dass in der *relA*- und *fruA*-Mutante das Sekretionssystem entweder nicht funktionsfähig ist oder gar nicht erst synthetisiert wird. Somit kann PopC während der Entwicklung nur in geringen Mengen oder gar nicht exportiert werden. Die Folge wäre eine gleichmäßige intrazelluläre Akkumulation von PopC während der Entwicklung.

Betreffend das Modell aus Abbildung 35, indem der Export von PopC aufgrund eines Protein-Komplexes nicht stattfinden kann, könnte man annehmen, dass der Proteinkomplex auch während der Entwicklung stabil bleibt. Erklären könnte man dies dadurch, dass in der *relA*- bzw. *fruA*-Mutante das Signal bzw. Protein, welches zur Auflösung des Komplexes benötigt wird, nicht vorhanden ist. Oder aber Expression des Gens, dessen Protein den Protein-Komplex mit PopC bildet, wird in diesen beiden Mutanten während Entwicklung nicht inhibiert und somit weiter synthetisiert. Die Folge beider Erklärungen wäre, dass PopC auch während der Entwicklung in einem Protein-Komplex gehalten wird und nicht exportiert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Ades, S. E., Connolly, L. E., Alba, B. M. & Gross, C. A. (1999). The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* **13**, 2449-2461.

Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. (2002). DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**, 2156-2168.

Andersen, C., Hughes, C. & Koronakis, V. (2001). Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 412-416.

Avery, L. & Kaiser, D. (1983). *In situ* transposon replacement and isolation of a spontaneous tandem genetic duplication. *Mol Gen Genet* **191**, 99-109.

Baker, M. E. (1994). *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal, is similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J* **301 (Pt 1)**, 311-312.

Balakrishnan, L., Hughes, C. & Koronakis, V. (2001). Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **313**, 501-510.

Barata, R. A., Andrade, M. H., Rodrigues, R. D. & Castro, I. M. (2002). Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. *J Biosci Bioeng* **94**, 304-308.

Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. . In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach.*, pp. 153-179. Oxford: Oxford University Press.

Bartra, S., Cherepanov, P., Forsberg, A. & Schesser, K. (2001). The *Yersinia* YopE and YopH type III effector proteins enhance bacterial proliferation following contact with eukaryotic cells. *BMC Microbiol* **1**, 22.

Bassler, B. L. & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell* **125**, 237-246.

Blackhart, B. D. & Zusman, D. R. (1985). Cloning and complementation analysis of the "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol Gen Genet* **198**, 243-254.

Blackhart, B. D. & Zusman, D. R. (1985). "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8767-8770.

Bowden, M. G. & Kaplan, H. B. (1996). The *Myxococcus xanthus* developmentally expressed *asgB*-dependent genes can be targets of the A signal-generating or A signal-responding pathway. *J Bacteriol* **178**, 6628-6631.

Bowden, M. G. & Kaplan, H. B. (1998). The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol* **30**, 275-284.

Boysen, A., Ellehauge, E., Julien, B. & Sogaard-Andersen, L. (2002). The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **184**, 1540-1546.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Chen, J. C., Hottes, A. K., McAdams, H. H., McGrath, P. T., Viollier, P. H. & Shapiro, L. (2006). Cytokinesis signals truncation of the PodJ polarity factor by a cell cycle-regulated protease. *EMBO J* **25**, 377-386.

Chen, J. C., Viollier, P. H. & Shapiro, L. (2005). A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Mol Microbiol* **55**, 1085-1103.

Cheng, L. W. & Schneewind, O. (2000). *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. *J Bacteriol* **182**, 3183-3190.

Cheng, Y. & Kaiser, D. (1989). *dsg*, a gene required for cell-cell interaction early in *Myxococcus* development. *J Bacteriol* **171**, 3719-3726.

Cheng, Y. & Kaiser, D. (1989). *dsg*, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability. *J Bacteriol* **171**, 3727-3731.

Cho, K. & Zusman, D. R. (1999). AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **34**, 268-281.

Clausen, T., Southan, C. & Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* **10**, 443-455.

Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825.

Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2001). Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* **20**, 5040-5048.

Davis, J. M., Mayor, J. & Plamann, L. (1995). A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 943-952.

Domian, I. J., Quon, K. C. & Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* **90**, 415-424.

Downard, J., Ramaswamy, S. V. & Kil, K. S. (1993). Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **175**, 7762-7770.

Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* **38**, 709-724.

Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. & Sogaard-Andersen, L. (1998). The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal coordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **30**, 807-817.

Fuller, R. S. (2004). Kexin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Edited by A. J. Barrett, Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. London: Elsevier.

Garza, A. G., Harris, B. Z., Greenberg, B. M. & Singer, M. (2000). Control of *asgE* expression during growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **182**, 6622-6629.

Garza, A. G., Pollack, J. S., Harris, B. Z., Lee, A., Keseler, I. M., Licking, E. F. & Singer, M. (1998). SdeK is required for early fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **180**, 4628-4637.

Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J. A., Ronning, C. M., Barbazuk, W. B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H. S., Mackenzie, C., Madupu, R.,

Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S. A., Vaudin, M., Wiegand, R. & Kaplan, H. B. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15200-15205.

Gronewold, T. M. & Kaiser, D. (2001). The *act* operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **40**, 744-756.

Hagen, D. C., Bretscher, A. P. & Kaiser, D. (1978). Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **64**, 284-296.

Hamann, N., Wegener-Feldbrügge, S., Sogaard-Andersen, L. & Hedderich, R. (2007). unpublished data.

Harlow, E. & Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Hart, B. A. & Zahler, S. A. (1966). Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **92**, 1632-1637.

Henrichsen, J. (1972). Gliding and twitching motility of bacteria unaffected by cytochalasin B. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* **80**, 623-624.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. (1979a). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): Genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**, 167-176.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. (1979b). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): Two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**, 177-191.

Hook, V. Y. & Hwang, S. R. (2002). Novel secretory vesicle serpins, endopin 1 and endopin 2: endogenous protease inhibitors with distinct target protease specificities. *Biol Chem* **383**, 1067-1074.

Horiuchi, T., Taoka, M., Isobe, T., Komano, T. & Inouye, S. (2002). Role of *fruA* and *csgA* genes in gene expression during development of *Myxococcus xanthus*. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* **277**, 26753-26760.

Ikemura, H. & Inouye, M. (1988). *In vitro* processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 12959-12963.

James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.

Jelsbak, L., Givskov, M. & Kaiser, D. (2005). Enhancer-binding proteins with a forkhead-associated domain and the sigma54 regulon in *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3010-3015.

Jenal, U. & Hengge-Aronis, R. (2003). Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol* **6**, 163-172.

Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5952-5956.

Kaiser, D. (2004). Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **58**, 75-98.

Kaiser, D. & Crosby, C. (1983a). Cell movements and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motil.* **3**, 227-245.

Kaiser, D. & Crosby, C. (1983b). Cell movements and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motil.* **3**, 275-284.

Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990). C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**, 19-26.

Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990). Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* **249**, 926-928.

Kim, S. K. & Kaiser, D. (1991). C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J Bacteriol* **173**, 1722-1728.

Kleerebezem, M. & Quadri, L. E. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**, 1579-1596.

Kroos, L., Hartzell, P., Stephens, K. & Kaiser, D. (1988). A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes Dev* **2**, 1677-1685.

Kroos, L. & Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev* **1**, 840-854.

Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N. M. & Sogaard-Andersen, L. (2001). C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **40**, 156-168.

Kuner, J. M. & Kaiser, D. (1982). Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **151**, 458-461.

Kuspa, A. & Kaiser, D. (1989). Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J Bacteriol* **171**, 2762-2772.

Kuspa, A., Kroos, L. & Kaiser, D. (1986). Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **117**, 267-276.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* **8**, 1600-1612.

Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A. N., Faull, K. F. & Lazazzera, B. A. (2007). Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **65**, 1321-1333.

Lee, B. U., Lee, K., Mendez, J. & Shimkets, L. J. (1995). A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)(+)-containing protein. *Genes Dev* **9**, 2964-2973.

Lee, K. & Shimkets, L. J. (1994). Cloning and characterization of the *socA* locus which restores development to *Myxococcus xanthus* C-signaling mutants. *J Bacteriol* **176**, 2200-2209.

Lee, K. & Shimkets, L. J. (1996). Suppression of a signaling defect during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **178**, 977-984.

Leonardy, S., Freymark, G., Hebener, S., Ellehauge, E. & Sogaard-Andersen, L. (2007). Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J*.

Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R. & Walker, J. C. (2000). The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J Cell Sci* **113 Pt 23**, 4143-4149.

Li, S., Lee, B. U. & Shimkets, L. J. (1992). *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* **6**, 401-410.

Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D. & Shi, W. (2003). Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5443-5448.

Licking, E., Gorski, L. & Kaiser, D. (2000). A common step for changing cell shape in fruiting body and starvation-independent sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **182**, 3553-3558.

Lobedanz, S. & Sogaard-Andersen, L. (2003). Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **17**, 2151-2161.

Magrini, V., Storms, M. L. & Youderian, P. (1999). Site-specific recombination of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: regulation of integrase activity by reversible, covalent modification. *J Bacteriol* **181**, 4062-4070.

McBride, M. J., Weinberg, R. A. & Zusman, D. R. (1989). "Fizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 424-428.

McCurdy, H. D. (1974). In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins.

McGrath, P. T., Iniesta, A. A., Ryan, K. R., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2006). A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell* **124**, 535-547.

Mecenas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. & Gross, C. A. (1993). The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* **7**, 2618-2628.

Merz, A. J., Enns, C. A. & So, M. (1999). Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* **32**, 1316-1332.

Mignot, T., Merlie, J. P., Jr. & Zusman, D. R. (2007). Two localization motifs mediate polar residence of FrzS during cell movement and reversals of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **65**, 363-372.

Mignot, T., Shaevitz, J. W., Hartzell, P. L. & Zusman, D. R. (2007). Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**, 853-856.

Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M. L., Denizot, F. & Rapoport, G. (1998). ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**, 899-914.

Ogawa, M., Fujitani, S., Mao, X., Inouye, S. & Komano, T. (1996). FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **22**, 757-767.

Ohta, Y., Hojo, H., Aimoto, S., Kobayashi, T., Zhu, X., Jordan, F. & Inouye, M. (1991). Pro-peptide as an intramolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide [corrected]. *Mol Microbiol* **5**, 1507-1510.

Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. & Jornvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**, 247-253.

Otto, K. & Hermansson, M. (2004). Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol* **186**, 226-234.

Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M. & Wernersson, S. (2007). Mast cell proteases. *Adv Immunol* **95**, 167-255.

Plamann, L., Davis, J. M., Cantwell, B. & Mayor, J. (1994). Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**, 2013-2020.

Plamann, L., Kuspa, A. & Kaiser, D. (1992). Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **174**, 3311-3318.

Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. & Mayor, J. (1995). The *Myxococcus xanthus* *asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* **177**, 2014-2020.

Pollack, J. S. & Singer, M. (2001). SdeK, a histidine kinase required for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **183**, 3589-3596.

Rasmussen, A. A., Porter, S. L., Armitage, J. P. & Sogaard-Andersen, L. (2005). Coupling of multicellular morphogenesis and cellular differentiation by an unusual hybrid histidine protein kinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **56**, 1358-1372.

Rasmussen, A. A. & Sogaard-Andersen, L. (2003). TodK, a putative histidine protein kinase, regulates timing of fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **185**, 5452-5464.

Rasmussen, A. A., Wegener-Feldbrugge, S., Porter, S. L., Armitage, J. P. & Sogaard-Andersen, L. (2006). Four signalling domains in the hybrid histidine protein kinase RodK of *Myxococcus xanthus* are required for activity. *Mol Microbiol* **60**, 525-534.

Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* **244**, 19-61.

Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* **1**, 15-21.

Rockwell, N. C. & Thorner, J. W. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* **29**, 80-87.

Rose, R. E. (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**.

Rosenberg, E., Keller, K. H. & Dworkin, M. (1977). Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J Bacteriol* **129**, 770-777.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn.* Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford, R. A., Cole, J. R. & Tiedje, J. M. (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol* **68**, 893-900.

Sawada, H., Yamazaki, K. & Hoshi, M. (1990). Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *J Exp Zool* **254**, 83-87.

Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.

Shimkets, L. J. (1986). Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **166**, 837-841.

Shimkets, L. J. & Dworkin, M. (1981). Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **84**, 51-60.

Shimkets, L. J., Gill, R. E. & Kaiser, D. (1983). Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1406-1410.

Shimkets, L. J. & Kaiser, D. (1982). Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **152**, 462-470.

Shimkets, L. J. & Rafiee, H. (1990). CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **172**, 5299-5306.

Siezen, R. J. & Leunissen, J. A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* **6**, 501-523.

Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6901-6904.

Smith, C. L., Khandelwal, P., Keliikuli, K., Zuiderweg, E. R. & Saper, M. A. (2001). Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. *Mol Microbiol* **42**, 967-979.

Smith, E. L., Markland, F. S., Kasper, C. B., DeLange, R. J., Landon, M. & Evans, W. H. (1966). The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *J Biol Chem* **241**, 5974-5976.

Sogaard-Andersen, L. & Kaiser, D. (1996). C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2675-2679.

Sogaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L. & Rasmussen, A. A. (2003). Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **48**, 1-8.

Sogaard-Andersen, L., Slack, F. J., Kimsey, H. & Kaiser, D. (1996). Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Genes Dev* **10**, 740-754.

Spormann, A. M. & Kaiser, A. D. (1995). Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **177**, 5846-5852.

Spratt, B. G., Hedge, P. J., te Heesen, S., Edelman, A. & Broome-Smith, J. K. (1986). Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**, 337-342.

Sun, H. & Shi, W. (2001). Analyses of *mrp* genes during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **183**, 6733-6739.

Sun, H., Zusman, D. R. & Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr Biol* **10**, 1143-1146.

Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.

Ueki, T. & Inouye, S. (2003). Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8782-8787.

Ueki, T. & Inouye, S. (2005). Identification of a gene involved in polysaccharide export as a transcription target of FruA, an essential factor for *Myxococcus xanthus* development. *J Biol Chem* **280**, 32279-32284.

Urban, S., Lee, J. R. & Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**, 173-182.

Urban, S., Lee, J. R. & Freeman, M. (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J* **21**, 4277-4286.

Urban, S. & Wolfe, M. S. (2005). Reconstitution of intramembrane proteolysis *in vitro* reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1883-1888.

Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13831-13836.

Vlamakis, H. C., Kirby, J. R. & Zusman, D. R. (2004). The Che4 pathway of *Myxococcus xanthus* regulates type IV pilus-mediated motility. *Mol Microbiol* **52**, 1799-1811.

Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. & Sauer, R. T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**, 61-71.

Wang, Y., Zhang, Y. & Ha, Y. (2006). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* **444**, 179-180.

Weinhold, A. & Wegener-Feldbrügge, S. (2007). unpublished data.

Wireman, J. W. & Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **129**, 798-802.

Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D. & Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Curr Biol* **12**, 369-377.

Wright, C. S., Alden, R. A. & Kraut, J. (1969). Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **221**, 235-242.

Wu, S. S. & Kaiser, D. (1995). Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 547-558.

Wu, S. S. & Kaiser, D. (1996). Markerless deletions of *pil* genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *J Bacteriol* **178**, 5817-5821.

Yang, R., Bartle, S., Otto, R., Stassinopoulos, A., Rogers, M., Plamann, L. & Hartzell, P. (2004). AglZ is a filament-forming coiled-coil protein required for adventurous gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **186**, 6168-6178.

Zeth, K. (2004). Structural analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm. *FEBS Lett* **569**, 351-358.

Zusman, D. R. (1982). "Fizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **150**, 1430-1437.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. PhD MD Lotte Sogaard-Andersen für die intensive Betreuung während meiner Arbeit. Ohne ihr Engagement, ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Vertrauen in mich, wäre diese Arbeit unmöglich gewesen.

Weiterhin möchte ich der Max-Planck-Gesellschaft als auch dem SFB395 für die Förderung meiner Arbeit, sowie Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für das Zweitgutachten, Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer und Herrn PD Dr. Michael Feldbrügge für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission danken.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Astrid Brandis-Heep. Danke für deine freundschaftliche Unterstützung, und dass du zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hattest.

Zudem danke ich allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Ökophysiologie für die angenehme Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Reiner Hedderich für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Danke - Steffi, Marie, Jörg und Jürgen für eure technische Unterstützung; Manfred für die administrative Hilfe und eine super Formatvorlage; Marie für die farblichen Highlights im Labor; Steffi für die netten, manchmal hart, aber herzlichen Gespräche nicht nur im Chemikalienraum; Sigrun und Nils für kollegiale Unterstützung und die Hilfe bei den Microarrays und der real-time PCR; Arne für die Alltagsweisheiten; Kryssia für die Gesellschaft in der Labor-Box; Gerald, Meike und Sebastian für die freundschaftliche Unterstützung, für die vielen Fragen, die ich euch stellen durfte und für die netten Gespräche während der Kaffeepause.

An dieser Stelle danke ich meinen lieben Freundinnen Nina, Maren, Sabrina, Bärbel, Meike und Andrea ganz herzlich. Einen besseren Ausgleich zum Laboralltag gibt es nicht. Das Gleiche gilt für alle Bekannten und Verwandten, die ich hier namentlich leider nicht alle erwähnen kann.

Ein riesiges „Dankeschön“ geht an meine Familie, besonders an meine beiden Geschwister Dirk und Regina, meine Großeltern, Paten und Schwiegereltern. Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht bei der Verfolgung meiner Zeile unterstützt haben und mir Rückhalt gaben. Papa, in solchen Momenten vermisste ich dich sehr!

Zu guter letzt möchte ich dem wichtigsten Mensch in meinem Leben danken - meinen Ehemann Marcus. Ohne seine Liebe, seine bedingungslose Unterstützung und unendliche Geduld hätte ich meine Träume nicht verfolgen können. Schön, dass es dich gibt!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Anne Ingrid Rolbetzki, geb. Blumenstein
Geburtstag:	06.08.1979
Geburtsort:	Kassel
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung

Juli 1986 – Juli 1990	Grundschule (Felsberg/Gensungen)
August 1990 – Juli 1996	Gesamtschule (Felsberg)
August 1996 – Juni 1999	Oberstufengymnasium (Melsungen)
Juni 1999	Abitur

Studium

Oktober 1999 – Oktober 2004	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Genetik und Biochemie
April 2002	Vordiplom
November 2003 – August 2004	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Fischer in der Abteilung Biochemie von Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer
August 2004	Diplom
Seit November 2004	Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. PhD MD Lotte Sogaard-Andersen in der Abteilung Ökophysiologie

Praktika

Februar 2002 – März 2002	Biochemie-Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L.-O. Essen am Fachbereich Chemie
April 2003 – Juli 2003	Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Fischer am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Aktivierung eines kontakt-abhängigen Signalsystems durch regulierte Proteolyse in *Myxococcus xanthus*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Anne Rolbetzki

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Aktivierung eines kontakt-abhängigen Signalsystems durch regulierte Proteolyse in *Myxococcus xanthus*“ in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, dass sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereitgehalten wird,
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird,
- der Universitätsbibliothek für die lokale Nutzung und für Fernausleihe zur Verfügung steht und
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den

Anne Rolbetzki,
Verfasserin

Prof. PhD MD Lotte Sogaard-Andersen,
betreuende Hochschullehrerin